Replikation des Plasmids pC194 in zellfreien Extrakten von B.subtilis: Abhängigkeit vom plasmidkodierten RepH-Protein

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gunnar Bläß
aus Berlin

Berlin 1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549614_0038

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33
Tel. 831 40 25

Replikation des Plasmids pC194 in zellfreien Extrakten von B.subtilis: Abhängigkeit vom plasmidkodierten RepH-Protein

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gunnar Bläß
aus Berlin

Berlin 1986

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Staudenbauer
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.5.1986

FÜR KARIN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1.EINLEITUNG	7
2.MATERIAL	14
2.1. Bakterien und Plasmide	14
2.2. Medien,Puffer und Lösungen	16
2.3. Enzyme und Proteine	19
2.4. Nukleinsäuren und Nukleotide	19
2.5. Chemikalien und Radiochemikalien	20
3.METHODEN	22
3.1. Allgemeine Methoden	22
3.1.1. Proteinbestimmung	22
3.1.2. Phenolextraktion	22
3.1.3. Isopropanolfällung	22
3.2. Züchtung und Aufbewahrung von Bakterien	23
3.3. DNA-Isolierung	23
3.3.1. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*	23
3.3.2. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus *B.subtilis*	24
3.3.3. Analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*	25
3.3.4. Analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus *B.subtilis*	26
3.4. *In vitro* Rekombination	27
3.4.1. Spaltung von DNA mit Restriktions-endonukleasen	27
3.4.2. Präparation von DNA-Fragmenten mit glatten Enden	29
3.4.3. Präparation von DNA-Einzelsträngen durch Exonuklease III	30

3.4.4. Abbau von DNA-Einzelsträngen durch S1-Nuklease 30
3.4.5. Erzeugung von gerichteten Deletionen durch Exonuklease III und S1-Nuklease 31
3.4.6. Dephosphorylierung von DNA am 5'-Ende durch alkalische Phosphatase 32
3.4.7. Ligation von DNA-Fragmenten 32
3.4.8. Transformation von E.coli-Zellen 33
3.4.9. Transformation von B.subtilis-Zellen 34
3.4.10. Induktion des tac-Promotors durch IPTG 35

3.5. Gelelektrophorese 36

3.5.1. Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren 36
3.5.2. Polyarcrylamid-Gelektrophorese von Proteinen 36
3.5.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen 37

3.6. In vitro DNA-Synthese 38

3.6.1. Präparation eines zellfreien E.coli-Extraktes 38
3.6.2. Präparation eines zellfreien B.subtilis-Extraktes 39
3.6.3. Messung der DNA-Synthese in vitro 40
3.6.4. Analyse der Replikationsprodukte 41

3.7. In vitro Proteinsynthese 41

3.8. Darstellung von replikativen Intermediaten 43

3.8.1. Isolierung und Cross-linking von replikativen Intermediaten 43
3.8.2. Elektronenmikroskopische Untersuchung 44

4.ERGEBNISSE 45

4.1. Klonierung des Cistrons C des Plasmids pC194 in den Expressionsvektor pUC18 45

4.1.1. Strategie 45

4.1.2. Klonierung des C-Fragmentes in den Vektor pUC18 45

4.1.3. Konstruktion von Deletionsmutanten des Plasmids pGB400 53

4.2. Klonierung und Expression des RepH-Gens des Plasmids pC194 in den Expressionsvektor pJF118(E,H) 54

4.2.1. Strategie 54

4.2.2. Klonierung des RepH-Gens 58

4.2.3. Expression des RepH-Gens 74

4.3. In vivo Komplementation einer RepH-Deletion 77

4.3.1. Strategie 77

4.3.2. Konstruktion der RepH-Mutante pHV14ΔNsiI 79

4.3.3. Konstruktion des Hybridplasmids pGB809-pUB110 80

4.3.4. In vivo Komplementation des Satelliten pHV14ΔNsiI durch das Helferplasmid pGB8091 84

4.4. Entwicklung eines pC194 Replikationssystems 87

4.4.1. Replikation des Plasmids ColE1 in zellfreien Extrakten von E.coli 87

4.4.2. Endogene DNA-Replikation des Plasmids pC194 in zellfreien Extrakten von B.subtilis 89

4.5. In vitro Komplementation der pC194-Replikation im zellfreien B.subtilis Extrakt durch das RepH-Protein 96

5.DISKUSSION 101

6.ZUSAMMENFASSUNG 110

7.ABKÜRZUNGEN 111

8.LITERATURVERZEICHNIS 112

9.LEBENSLAUF 125

1. EINLEITUNG

Plasmide sind extrachromosomale, doppelsträngige DNA-Moleküle, die sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten vorkommen, und deren Größe von zwei bis zu mehreren hundert Kilobasen reicht. Im Vergleich dazu besteht das E.coli Chromosom aus 3-4 X 10^6 Basenpaaren. Plasmide tragen häufig die genetische Information für Eigenschaften, die ihren Wirten einen entscheidenden Selektionsvorteil bieten können. So kodieren einige DNA-Abschnitte für Genprodukte, die für die Inaktivierung von Antibiotika oder für die Produktion von Toxinen verantwortlich sind. Plasmidkodierte Antibiotika-Resistenzen und deren Verbreitung unter pathogenen Bakterienstämmen stellen ein schweres Problem bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten dar. Deshalb könnte das Studium der Plasmidreplikation von praktischer medizinischer Bedeutung sein (Collins 1984). In den letzten Jahren haben Plasmide eine enorme praktische Bedeutung in der Gentechnologie gewonnen, in der sie überwiegend als Klonierungsvektoren Verwendung finden. Aufgrund ihrer geringen Größe dienen Plasmide außerdem als exzellente Modellsysteme für die Replikation des genetischen Materials.

Plasmide stellen autonome, selbstreplizierende Einheiten dar, die in einem Bakterium mit relativ konstanter Kopienzahl vorkommen. Dieser Sachverhalt weist auf eine Regulation der Initiation der Plasmidreplikation in der Bakterienzelle hin. Plasmide lassen sich in zwei Klassen unterteilen, die sich hinsichtlich ihrer Größe und ihrer Kopienzahl unterscheiden (Staudenbauer 1978). Zum einen existieren Plasmide mit einem hohen Molekulargewicht, das zwischen 50 und 100 Md liegt(z.B. F-Faktor, R1, P1), und die in einer niederen Kopienzahl von 1-5 Kopien pro Zelle vorliegen. Die andere Gruppe von Plasmiden besitzt ein niedriges Molekulargewicht (<10 Md) und eine hohe Kopienzahl, die zwischen 20 und 100 je nach Plasmidart variiert. Die Plasmide der ersten Gruppe sind größtenteils zur Kon-

jugation befähigt und besitzen sogenannte tra-Gene, die für die Ausbildung der Pili verantwortlich sind.

Eine zweite wichtige Klassifizierung beruht auf einer Eigenschaft die als Inkompatibilität bezeichnet wird und als Maß für den Verwandtschaftsgrad von Plasmiden dient. Das Vorhandensein eines Plasmids in einer Bakterienzelle beeinträchtigt die Vermehrung eines zweiten Plasmids mit einer ähnlichen oder identischen Replikationskontrolle. Die Mechanismen, die die Plasmidreplikation und die Verteilung von Plasmiden auf die Tochterzellen regulieren, können nicht zwischen zwei verwandten Plasmiden differenzieren, so daß die beiden Plasmide zufällig auf die Tochterzellen verteilt werden. Alleine für E.coli sind über 20 Inkompatibilitätsgruppen bekannt.

Plasmide können in Bezug auf ihre Replikation als hochgradig spezialisierte Parasiten angesehen werden (Scott 1984). So benutzen sie für ihre Verdopplung viele Replikationsproteine, die die Wirtszelle produziert und zur Replikation des Bakterienchromosoms benötigt. Plasmide enthalten mindestens einen Startpunkt der DNA-Synthese (Origin), von dem die DNA-Replikation uni- oder bidirektional abläuft. Die Regulation der Plasmidreplikation wird für gewöhnlich von plasmidkodierten Funktionen gesteuert, die eine Erkennung des plasmidspezifischen Origins durch die wirtskodierten Replikationsproteine gewährleisten (Nordström 1982). Dabei wenden verschiedene Plasmide recht unterschiedliche Methoden an:

So replizieren das am besten untersuchte Plasmid ColE1 (20 Kopien pro Zelle) und ColE1-Typ Plasmide in E.coli unidirektional von einem Origin aus. Bei der Initiation der Replikation wird ein RNA-Transkript (RNA II) durch die RNA-Polymerase des Wirts in den Origin-Bereich hineinsynthetisiert. Durch dieses Transkriptionsereignis wird der Origin-Bereich der Plasmid-DNA aufgeschmolzen. Dabei kommt es zur Ausbildung eines RNA/DNA Hybrids, das von einem weiteren Wirtsenzym - der RNaseH - prozessiert

wird, so daß ein freies 3´ OH-Ende dieser RNA als Primer für die DNA-Polymerase I dienen kann. Die Polymerase verlängert dann die RNA mit Desoxyribonukleotid-Monophosphaten. Die Regulation der RNA II verläuft wahrscheinlich über zwei negative Kontrollmechanismen. Zum einen wird eine 100 Bp lange Inhibitor-RNA (RNA I) in entgegengesetzter Richtung zur RNA II synthetisiert. Diese RNA I kann über eine RNA/RNA Wechselwirkung mit der RNA II interagieren. Dabei wird die RNA II derart in ihrer Sekundärstruktur verändert, daß es nicht mehr zur Ausbildung des RNA/DNA Hybrids im Origin und dessen Prozessierung durch die RNaseH kommen kann (Tomizawa und Itoh 1981, Lacatena und Cesareni 1983). Der zweite Kontrollmechanismus beruht auf der Expression eines 6,5 kd großen Rom-Proteins (Chan et al. 1985), das die Bindung der Inhibitor-RNA an die RNA II verstärkt.

Grundsätzlich anders verläuft die Regulation der DNA-Synthese beim Resistenzfaktor R1, der mit kb zu den großen Plasmiden zu rechnen ist (1-3 Kopien pro Zelle). Dieses Plasmid kodiert für ein 33 kd großes RepA-Protein, das als Initiator positiv die Replikation steuert. Das Initiationsprotein wiederum wird durch ein kleines Protein negativ reguliert, das im copB Gen kodiert. Eine zweite negative Kontrollfunktion wird von einer 80 Bp kurzen RNA, die mit der mRNA des RepA-Proteins interagiert, wahrgenommen (Diaz et al. 1981, Light und Molin 1982, Diaz und Ortega 1984).

Eine weitere Variante der Regulation der Plasmidreplikation liegt beim Plasmid RSF1010 vor, das eine hohe Kopienzahl und ein weites Wirtsspektrum besitzt. Dieses Plasmid kodiert für drei eigene Replikationsproteine und repliziert damit unabhängig von mehreren Wirtsenzymen; so benötigt es in E.coli weder die RNA-Polymerase noch die dnaB und dnaC Proteine, die im Primosom die ´lagging´ Strangsynthese starten (Kornberg 1980). Von den plasmidkodierten Proteinen bindet das RepC Protein - vergleichbar dem

O-Protein von λ - an vier repetitive DNA-Sequenzen im Origin-Bereich und initiiert über diese Bindung die Plasmidreplikation (Scholz et al. 1985).

Die am besten untersuchten *in vitro* Replikationssysteme wurden für Plasmide aus grampositiven Bakterien, vor allem aus *E.coli*, entwickelt: ColE1 (Tomizawa et al. 1974), R6K (Inuzuka und Helinski 1978), miniR1 (Diaz et al. 1981) und RSF1010 (Diaz und Staudenbauer 1982). Allerdings erweitert sich in letzter Zeit das Interesse auch auf Plasmide, die aus grampositiven Organismen stammen, und hier besonders aus *B.subtilis*. Das Interesse an diesem Bakterium kann auf verschiedene Gründe zurückgeführt werden:

a) *B.subtilis* ist ein harmloses Bodenbakterium, das sich phylogenetisch deutlich von dem gramnegativen Darmbakterium *E.coli* unterscheidet.

b) *B.subtilis* ist genetisch sehr gut charakterisiert; etliche Replikationsmutanten sind beschrieben (Bazill und Karamata, 1972).

c) Zudem ist *B.subtilis* für die Fermentationsindustrie von großem Interesse, da es im Gegensatz zu *E.coli* keine Endotoxine produziert (Ehrlich, 1978a,b, Dubnau et al. 1980).

Ein Nachteil dieses Bakteriums bestand allerdings in der Tatsache, daß nur kryptische Plasmide bekannt waren, die als Klonierungsvektoren ungeeignet sind. Aus diesem Grund wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Antibiotika-resistente Plasmide aus *S.aureus* isoliert und durch Transformation nach *B.subtilis* transferriert (Ehrlich 1977, Löfdahl et al. 1978).

Eines dieser Plasmide mit dem Namen pT181 wurde von Novick und Mitarbeitern näher charakterisiert. Das Plasmid kommt mit etwa 20 Kopien in der Bakterienzelle vor. Mit Hilfe eines *in vitro* Replikationssystems in *S.aureus* (Khan et al. 1981) gelang es, den Origin von pT181 zu kartieren (Khan et al. 1982). Das Plasmid pT181 kodiert für ein Replikationsprotein (RepC) (Novick et al. 1982). Zudem wurde das gesamte 4,4 kb große Plasmid sequenziert (Khan und Novick 1983).

Ein weiteres Plasmid wurde 1975 von Iordanescu aus dem Bakterienstamm S.aureus SA194 isoliert (siehe Abb.1). Dieses Plasmid (pC194) besitzt einen breiten Wirtsbereich; so repliziert es nicht nur in den meisten grampositiven Bakterien, wie z.B. in Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis (Ehrlich 1977), Bacillus thuringiensis (Martin et al. 1981), Bacillus megaterium (Brown und Carlton 1980) und Streptococcus pneumoniae (Barany und Tomasz 1980). Vielmehr gibt es Hinweise dafür, daß eventuell auch eine Replikationsfunktion des Plasmids in Escherichia coli (Goze und Ehrlich 1980) und sogar in Saccharomyces cerevisiae (Goursot et al.1982) aktiv sein könnte. Das Plasmid pC194 wird als wichtiger B.subtilis Klonierungsvektor verwendet (Ehrlich et al. 1978, 1981), ist 2906 Bp groß und exprimiert eine Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT). Die Expression dieses CAT-Gens kann durch niedrige Chloramphenicol-Konzentrationen induziert werden (Winshall und Shaw 1969). In Minizellen können zwei plasmidkodierte Proteine mit einem Molekulargewicht von 22.000 d und 11.000 d nachgewiesen werden (Shivakumar et al. 1978). Das Plasmid besitzt gentechnologisch gesehen den großen Vorteil, daß seine gesamte DNA-Sequenz bekannt ist (Horinouchi und Weisblum 1982). Dabei werden vier offene Leseraster gefunden, die für vier hypothetische Proteine kodieren könnten. Horinouchi und Weisblum wiesen nach, daß der Leseraster B der Chloramphenicol-Acetyltransferase entspricht, und somit für die Resistenz plasmidhaltiger Bakterienzellen gegen dieses Antibiotikum verantwortlich ist. Das CAT-Gen liegt auf einem DNA-Abschnitt zwischen den Basen 1260 und 1907. Der Leseraster C könnte eine Replikationsfunktion determinieren (Horinouchi und Weisblum 1982). Iordanescu und Surdeanu (1983) zeigten durch in vivo Studien, daß das Plasmid pC194 die genetische Information für ein Replikationsprotein besitzt. Es wurde vermutet, daß dieses RepH genannte Replikationsprotein vom offenen Leserahmen C kodiert wird.

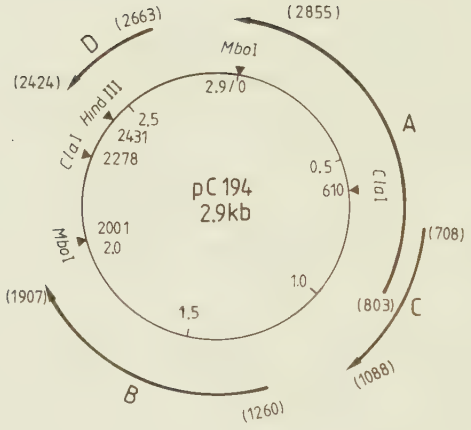

Abb.1: Restriktionskarte des Plasmids pC194
Die Lage der Schnittstellen geht auf die Daten von Horinouchi (1982) mit der Korrektur von Dagert (1984) zurück. Die Karte zeigt außerdem die Gene für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (Leseraster B) und für das RepH-Protein (Leseraster A), sowie für zwei weitere, bisher noch hypothetische Proteine (Leseraster C und D).

Die Problemstellung dieser Arbeit bezieht sich auf zwei Aspekte der pC194-Replikation:

1) Identifizierung des RepH Proteins des Plasmids pC194 und Überproduktion dieses Replikationsproteins durch Klonierung in einen E.coli Expressionsvektor. Es wird gezeigt, daß nicht der offene Leseraster C sondern der Leserahmen A für das RepH-Protein kodiert.

2) Entwicklung eines RepH-abhängigen pC194 Replikationssystems aus zellfreien Extrakten von B.subtilis.

2.MATERIAL

2.1. Bakterien und Plasmide

BAKTERIENSTÄMME:

E.coli HB101
F^-, *hsd*S20 (r_B^-,m_B^-), *rec*A13, *ara*14, *pro*A2, *lac*Y1, *gal*K2, *rps*L20 (Sm^r), *xyl*5, *mtl*1, *sup*E44 (Boyer et al. 1969)

E.coli C600
F^-, *thi*1, *thr*1, *leu*B6, *lac*Y1, *ton*A21, *sup*E44 (Appleyard 1954)

E.coli DH1
F^-, *thi*1, *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *hsd*R17 (r_k^-,m_k^+), *sup*E44 (Low 1968)

E.coli JM101
Δ(*lac-pro*AB), *thi*1, *sup*E44, F´: *tra*D36, *pro*AB, *lac*I ^{q}, ZΔM15 (Messing et al. 1981)

E.coli JM107
*end*A1, *gyr*A96, *thi*, *hsd*R17, *sup*E44, *rel*A1,Δ(*lac-pro*AB), F´: *tra*D36, *pro*AB, *lac*I ^{q}, ZΔM15 (Yanish-Perron et al. 1985)

E.coli JM83
ara, Δ(*lac-pro*AB), *rps*L, Ø80: *lac*Z ΔM15 (Yanish-Perron et al. 1985)

B.subtilis BD170
*trp*C2, *thr*5 (Dubnau und Cirigliano 1974)

B.subtilis BR151
*trp*C2, *lys*3, *met*B10 (Young et al. 1969)

B.subtilis YB1000
*trp*C2, *met*B10, *thy*A, *thy*B, xin^-, $ß^-$ (Ellis et al. 1981)

PLASMIDE:

Tab.1: Auflistung der verwendeten Plasmide

Plasmid	Molekulargewicht(kb)	Phänotyp	Quelle/Literatur
pC194	2,9	Cm^r	Trautner/Iordanescu 1975
pC194-1	2,9	Cm^r,cop	Alonso/Canosi et al. 1982
pHV14	7,3	Ap^r,Tc^r,Cm^r	Trautner/Goze 1980
pUB110	4,5	Km^r	Alonso/Lacey,Chopra 1974
ColE1	6,5	Colicin E1	Staudenbauer 1978
pBR322	4,4	Tc^r,Ap^r	Bolivar et al. 1977
pUC18	2,7	Ap^r,lacO,P,Z MCS	BRL/Yanish-Perron et al.1985
pJF118(E,H)	5,3	Ap^r,$lacI^q$, MCS,tac	Lanka und Mitarbeiter
			Konstruktion
pGB400-403	4,4	Ap^r,Cm^r,C^+	pUC18 X C-Fragment
pGB450-460	4,4	Ap^r,Cm^r,C^+	Deletionsderivate von pGB400
pGB712,716	6,4	Ap^r,$repH^+$	pJF118 X A-Fragment
pGB809,881	6,2	Ap^r,$repH^+$	pJF118 X A1-Fragment
pGB8091-7	10,7	Ap^r,Km^r,$repH^+$	pUB110 X pGB809
pHV14 NsiI	6,8	Ap^r,Cm^r,$repH^-$	RepH Mutante von pHV14

MCS = multiple cloning site, tac = tac-Promotor

cop = Kopienzahl-Mutante, C = Cistron C von pC194

2.2. Medien, Puffer und Lösungen

MEDIEN:

TY-Vollmedium

In einem Liter Medium sind gelöst:

10 g Trypton (Oxoid)
5 g Hefeextrakt (Merck)
5 g NaCl

Dem sterilen Medium wurden in Lösung hinzugefügt:

25 mg Thymin (Sigma)
25 mg Thiamin-Hydrochlorid (Sigma)
4 g Glukose

Der pH-Wert des Mediums wurde mit 5 M KOH auf 7,6 eingestellt.

M9-Medium

In einem Liter Medium sind gelöst:

7,5 g $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$
3,0 g KH_2PO_4
0,5 g NaCl
1,0 g NH_4Cl
0,1mg $FeCl_3 \times 6\ H_2O$

Dem sterilen Medium wurden in Lösung hinzugefügt:

0,2 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$
25mg Thymin
25mg Thiamin-Hydrochlorid
4 g Glukose

TY-Platten : wie TY-Vollmedium, aber mit 1,5% Agar

TY Top-Agar: wie TY-Vollmedium, aber mit 0,75% Agar

Antibiotika-Platten: wie TY-Platten, aber mit

10 µg/ml Chloramphenicol,
50 µg/ml Ampicillin,
25 µg/ml Kanamycin,
20 µg/ml Nalidixinsäure

PUFFER:

Puffer A:

10 mM Tris-HCl (pH=7,6)
10 mM NaCl
1 mM EDTA

Puffer B:

10 % (w/v) Saccharose
5 % (w/v) Triton X-100
25 mM EDTA
50 mM Tris-HCl (pH=7,6)

Puffer C:

10 mM Tris-HCl (pH=7,6)
10 mM $MgCl_2$
1 mM DTT

Puffer D:

wie Puffer C, aber mit 50 mM NaCl

Puffer E:

wie Puffer C, aber mit 100 mM NaCl

Puffer F:

wie Puffer C, aber mit 20 mM KCl

Puffer G:

25 mM MOPS (γ-Morpholino-propansulfonsäure)
100 mM Rubidiumchlorid
45 mM Mangan(II)-chlorid
10 mM Calciumchlorid
3 mM Kobalt(III)-hexamminchlorid

Puffer H:

40 mM Tris-Acetat (pH=7,9)
2 mM EDTA

Puffer I:

20 % Ficoll
1 % SDS
0.1 % Bromphenolblau

Puffer J:

50 mM Hepes-KOH (pH=8,0)
50 mM KCl
1 mM DTT
1 mM EDTA

Puffer K:

25 mM Hepes-KOH (pH=8,0)
100 mM KCl
1 mM DTT
5 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)
2 mM p-Aminobenzamidin-dihydrochlorid

LÖSUNGEN:

Stop-Mix:

0,5 M NaOH
0,5 % (w/v) SDS
10 % (w/v) gesättigte Natriumpyrophosphat-Lösung(6,7g/l)
0,5 mg/ml Kalbsthymus-DNA

Szintillatorlösung:

14 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO)
4,5 g 2,2´-p-Phenylen-bis-5-phenyloxazol (POPOP)
Die Chemikalien wurden in 5 l Toluol gelöst.

Brij-Mix:

10 % (w/v) Brij 58
4 % (w/v) Natriumdesoxycholat
0,06 M EDTA
0,05 M Tris-HCl (pH=8,0)

2.3. Enzyme und Proteine

Restriktionsendonukleasen: (AccI, BamHI, BglI, ClaI, DdeI, EcoRI, HindIII, KpnI, NaeI, NsiI, PvuII, SmaI, TaqI)	BRL, Boehringer, Biolabs
Exonuklease III aus E.coli	BRL
Nuklease S1 aus Aspergillus oryzae	Boehringer
Nuklease Bal31 aus Alteromonas espejiani	Boehringer
Endonuklease aus Neurospora crassa	Boehringer
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	Boehringer
DNA-Polymerase I(Klenow-Fragment) aus E.coli	BRL
T4 DNA-Ligase aus E.coli	Boehringer
Kreatin-Kinase	Boehringer
Proteinase K	Boehringer
RNase A	BRL
Referenzproteine:	
Rinderserumalbumin 68.000 d	Boehringer
Ovalbumin 43.000 d	BRL
Carboanhydrase 30.000 d	BRL
Chymotrypsinogen A 25.700 d	BRL
ß-Lactoglobulin 18.400 d	BRL
Lysozym 14.300 d	Boehringer
Cytochrom C 12.800 d	Boehringer

2.4. Nukleinsäuren und Nukleotide

Kalbsthymus-DNA	Sigma
Desoxyribonukleosid-Triphosphat (dNTP)	Boehringer
Ribonukleosid-Triphosphat (rNTP)	Boehringer
NAD (ß-Nicotinamid-adenin-dinukleotid)	Boehringer
cAMP (zyklisches Adenosin-Monophosphat)	Boehringer
araCTP (1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin-Triphosphat)	Sigma
ØX174 RF-DNA HaeIII-Fragmente	BRL

Plasmid-DNA wurde gemäß Abschnitt 3.3. präpariert.

2.5. Chemikalien und Radiochemikalien

CHEMIKALIEN:

Acrylamid	Biorad
Agarose	Biorad
p-Aminobenzamidin-dihydrochlorid	Sigma
Ammoniumsulfat	Baker
Ammoniumpersulfat	Biorad
Antibiotika:	
Ampicillin	Serva
Chloramphenicol	Boehringer
Coumermycin	Serva
Kanamycinsulfat	Boehringer
Novobiocin	Sigma
Rifampicin	Calbiochem
Streptolydigin	Serva
Streptomycinsulfat	Serva
Tetracyclin-Hydrochlorid	Serva
Brij 58 (Polyoxyethylen-20-cethylether)	Serva
CMS (p-Chloromercuriphenylsulfonylsäure)	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva
DTT (Dithiothreitol)	Serva
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck
Ethidiumbromid	Boehringer
Ficoll 400	Pharmacia
Hepes (N-2-Hydroxyethylpiperacin-N´-2-ethansulfonsäure)	Serva
HPUra (6-p-hydroxyphenylazouracil)	Imp.Ch.Ind.
IPTG (Isopropyl-ß-D-thiogalacto-pyranosid)	BRL
Mops (3-N-Morpholino-propansulfonsäure)	Sigma
NEM (N-etylmaleimid)	Sigma
PAA (Phosphonoessigsäure)	Sigma
Phenol	BRL
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma
PEG (Polyethylenglykol)	Serva

SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Schwarz
Triton X-100	Serva
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactosid)	BRL

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck bezogen.

RADIOCHEMIKALIEN:

[methyl-^{3}H]-Thymidin-5'-Triphosphat (40Ci/mmol)	Amersham
Deoxyadenosin-5'-α-[^{35}S]-thio-triphosphat (800Ci/mmol)	Amersham
L-[^{35}S]-Methionin (800Ci/mmol)	Amersham
[^{14}C]-methylierte Proteinmarker (10µCi/µg Protein)	Amersham

3.METHODEN

3.1. Allgemeine Methoden

3.1.1. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Extrakten wurde nach der Methode von Spektor (1977) durchgeführt. Ein Aliquot der zu untersuchenden Probe wurde mit destilliertem Wasser verdünnt und auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht. Anschließend wurden 1,9 ml Spektorlösung zugegeben, gemischt und 5 Minuten später die Extinktion der Lösung bei 595 nm gegenüber einer Blindprobe im Photometer gemessen. Aus einer Eichkurve, die mit Rinderserumalbumin aufgestellt worden war, konnte die Proteinkonzentration der Probe bestimmt werden.
Die Spektorlösung hatte folgende Zusammensetzung:

100 mg G-250 Coomassie Brilliant Blue
50 ml Ethanol
100 ml 85%-ige H_3PO_4
mit H_2O auf 1 l auffüllen

3.1.2. Phenolextraktion

Reaktionen zur *in vitro* DNA-Rekombination wurden gewöhnlich durch Extraktion der jeweiligen DNA-spezifischen Proteine mit Phenol beendet. Dazu wurde zum Reaktionsansatz ein Volumen Phenol-Lösung (Phenol gesättigt mit 0,1 M Tris-Base) gegeben und gut gemischt. Nach kurzer Zentrifugation zur Trennung der beiden Phasen wurde die wäßrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Wiederholung der Phenolextraktion wurde restliches Phenol aus der wäßrigen Phase durch zweimalige Extraktion mit 50 Volumen Diethylether entfernt. Die DNA wurde danach durch Isopropanol-Fällung (vgl. Abschnitt 3.1.3.) gewonnen.

3.1.3. Isopropanol-Fällung

DNA kann durch Alkohol ausgefällt werden. Dazu wurde die DNA (in Puffer A suspendiert) mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (mit Essigsäure auf pH=4,8 eingestellt) und 1 Volumen Isopropanol versetzt. Ausgefällt wurde die DNA bei

-70°C für 30 Minuten und anschließend abzentrifugiert (15 Min., 0°C, 15.000 Upm). Das trockene Pellet wurde in Puffer A aufgenommen.

3.2. Züchtung und Aufbewahrung von Bakterien

Bakterienkulturen von E.coli bzw. B.subtilis wurden in TY-Vollmedium bei 37°C unter guter Belüftung bis zu der gewünschten Zelldichte angezogen. Der pH-Wert der Kultur (pH=7,5) wurde während der Wachstumsphase durch Zugabe von 5 N KOH laufend nachjustiert. Die Generationszeit der Bakterien lag üblicherweise zwischen 40 und 50 Minuten. Aufbewahrt wurden die Bakterienstämme kurzfristig (1 Woche) auf den entsprechenden Antibiotikaplatten im Kühlschrank oder längerfristig als Glycerinkultur (1 ml Übernachtkultur + 1 ml Glycerin) eingefroren bei -70°C.

3.3. DNA-Isolierung

3.3.1. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

Das Verfahren beruht im wesentlichen auf der Methode von Clewell und Helinski (1969).
Eine 800 ml-Übernachtkultur des jeweiligen plasmidhaltigen E.coli-Stammes wurde abzentrifugiert (GS3-Rotor, 15 Min., 4°C, 7000 Upm). Das Pellet wurde in 11 ml Saccharose-Lösung (25 % (w/v) Saccharose, 50 mM Tris-HCl, pH=8.0) suspendiert und mit 1,8 ml Lysozym-Lösung (5 mg/ml) und 3,6 ml einer 0,25 M EDTA-Lösung versetzt. Die Zellsuspension wurde leicht gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 15 ml Brij-Mix zupipettiert. Nach ungefähr 1o Minuten bei Raumtemperatur lysierten die Bakterienzellen und das Gemisch wurde viskos. Die Zelltrümmer und anhaftende chromosomale DNA wurden durch Zentrifugation im 45 Ti-Rotor (1o Min., 15°C, 30.000 Upm) abgetrennt. 32 ml des klaren Überstandes wurden mit 31 g Cäsiumchlorid und 2 ml einer Ethidiumbromid-Lösung (1o mg/ml) versetzt. Danach wurde die Lösung in Quick-Seal Röhrchen (Beckmann) überführt und im VTi 50-Rotor bei 15°C und 46.000 Upm zentrifugiert. Nach 2o Stunden wurde der

Gleichgewichtslauf beendet. Im langwelligen UV-Licht (366 nm) wurden im Gradienten zwei DNA-Banden sichtbar. Die obere Bande enthielt chromosomale DNA, die relativ viel Ethidiumbromid bindet und damit ein niedrigeres spezifisches Gewicht besitzt. In die superhelikale Plasmid-DNA (untere Bande) lagert sich dagegen weniger Ethidiumbromid ein, so daß diese DNA bei einer höheren Dichte im Cäsiumchlorid-Gradienten eine Bande bildet. Durch Anstechen der Röhrchen am Boden konnte die Plasmidbande beim Austropfen gezielt abgetrennt werden. Eine zweite Dichtegradienten-Zentrifugation (VTi 65, 20 Stunden, 15°C, 46.000 Upm) wurde angeschlossen und die Plasmidbande erneut wie bei der ersten Reinigung isoliert. Die Plasmid-DNA wurde viermal mit Cäsiumchlorid-gesättigtem Isopropanol ausgeschüttelt, um das Ethidiumbromid zu entfernen. Anschließend wurde die DNA-Lösung mit 3 Volumen Wasser verdünnt und mit demselben Volumen Isopropanol versetzt. Die Alkoholfällung der DNA wurde bei -70°C über einen Zeitraum von 30 Minuten durchgeführt. Hinterher wurde die DNA durch Zentrifugation (GSA-Rotor, 30 Min., 0°C, 7000 Upm) gewonnen. Das trockene Pellet wurde in 500 µl Puffer A aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die Ausbeute lag typischerweise zwischen 0,5 und 1,0 mg DNA/l Zellkultur.

3.3.2. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus B.subtilis

Die im Kapitel 3.3.1. beschriebene Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA läßt sich nicht auf B.subtilis-Plasmide anwenden, da eine zu breite Bande chromosomaler DNA sich mit der Plasmidbande überlagert und eine Trennung stark erschwert. Deshalb wurde auf eine Kombination der Methoden von Guerry et al. (1973) und Humphrys et al. (1975) zurückgegriffen:
Ausgegangen wurde von einer 2 l-Übernachtkultur des entsprechenden plasmidhaltigen B.subtilis-Stammes. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (GS3-Rotor, 15

Min., 4°C, 7.000 Upm). und in 64 ml 25 % (w/v) Saccharose - 16 ml Lysozym (5 mg/ml) - 50 mM Tris-HCl (pH=8,0) - 32 ml 0,25 M EDTA (pH=8,0) suspendiert. Diese Suspension wurde in einen 1 l Erlenmeyerkolben überführt, 5 Minuten bei 0°C langsam geschüttelt und dann mit 1/9 Volumen 10 % (w/v) SDS versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C lysierten die Zellen und 1/4 Volumen 5 M NaCl wurde zupipettiert. Nach 4 Stunden im Eisbad bzw. über Nacht bei 4°C wurde die klare Suspension mit 1 Volumen 50 mM Tris-HCl (pH=8,0) versetzt und der entstandene Niederschlag (SDS, Proteine und ein Teil der chromosomalen DNA) abzentrifugiert (GSA-Rotor, 30 Min., 4°C, 10.000 Upm). Um die Plasmid-DNA zu präzipitieren, wurde zum Überstand 1/4 Volumen 50 % (w/v) PEG 6000 gegeben, 4 Stunden im Eisbad oder über Nacht bei 4°C inkubiert und anschliessend erneut zentrifigiert (GSA-Rotor, 30 Min., 4°C, 10.000 Upm). Das DNA-Pellet wurde in 120 ml Puffer A resuspendiert, und pro ml Lösung wurde 1 g CsCl zugegeben. Danach wurde 1/15 Volumen Ethidiumbromid , (10 mg/ml) zupipettiert und der auftretende Niederschlag abzentrifugiert (GSA-Rotor, 15 Min., 15°C, 10.000 Upm). Je 39 ml des klaren, roten Überstandes wurden in Quick-Seal-Röhrchen (Beckman) überführt und im VTi 50-Rotor bei 15°C und 46.000 Upm für 20 Stunden zentrifugiert. Die weitere DNA-Aufarbeitung erfolgte wie unter 3.3.1. beschrieben.

3.3.3. Analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

Zur Isolierung und schnellen Analyse von Plasmiden aus E.coli wurde eine Modifikation der Methode von Holmes und Quigley (1981) verwendet. Eine 5 ml Übernachtkultur der plasmidhaltigen Bakterienzellen wurde in Correx 20 Röhrchen überführt und anschließend abzentrifugiert (SS34-Rotor, 5 Min., 4°C, 6000 Upm). Das Pellet wurde in 450 µl Puffer B aufgenommen, mit 50 µl Lysozymlösung (10 mg/ml) versetzt und 90 Sekunden im Wasserbad bei 100°C aufgekocht. Danach wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (SS34-Rotor, 30 Min., R.T., 15.000 Upm). Die DNA wurde aus

dem klaren Überstand durch die Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und anschließendem Einfrieren in flüssigem Stickstoff ausgefällt. In der folgenden Zentrifugation (SS34-Rotor, 20 Min., 0°C, 15.000 Upm) wurde die DNA als Niederschlag gewonnen. Das Pellet wurde im Vakuum getrocknet und in 100 µl Puffer A aufgenommen. Etwa 5 µl der Probe waren ausreichend für eine gelelektrophoretische Charakterisierung der DNA. Für eine Restriktionsanalyse der DNA wurde die Probe mit RNase A (Endkonzentration 10 µl/ml) versetzt, um störende RNA-Reste in der Probe weitgehend abzubauen.

3.3.4. Analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus B.subtilis

Da die Isolierung von Plasmiden aus B.subtilis nach der Methode von Holmes und Quigley (1981) zu sehr schlechten Ausbeuten führte, wurde die Methode von Birnboim und Doly (1979) verwendet. Das Prinzip besteht in der selektiven Denaturierung der hochmolekularen, chromosomalen DNA unter alkalischen Bedingungen. Dagegen ist die kleinere, superhelikale Plasmid-DNA weitgehend unempfindlich gegen diese Behandlung.

Ausgegangen wurde von einer 10 ml Übernachtkultur. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (SS34-Rotor, 5 Min., R.T., 6000 Upm) und in 1 ml frisch angesetzten Lysozymlösung (2 mg/ml Lysozym, 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH=8,0) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurden die Bakterienzellen lysiert und die Suspension wurde stark trüb. Nach Zugabe von 2 ml einer 0,2 M NaOH - 1 % (v/v) SDS-Lösung (haltbar eine Woche) und vorsichtigem Mischen klarte die Suspension auf und wurde leicht viskos. Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur, wurde die Lösung durch Mischen mit 1,5 ml einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH=4,8) neutralisiert. Proteine und chromosomale DNA fielen aus und konnten nach 60 Minuten bei 0°C abzentrifugiert werden (SS34-Rotor, 10 Min., 4°C, 15.000 Upm). 4 ml des klaren

Überstandes wurden abgenommen und mit einem Volumen Isopropanol versetzt. Dabei wurde die DNA in flüssigem Stickstoff eingefroren und nach dem Auftauen bei Raumtemperatur durch Zentrifugation (SS34-Rotor, 20 Min., 0°C, 15.000 Upm) gewonnen. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 100 µl Puffer A aufgenommen. Zur Analyse der Plasmid-DNA im Agarose-Gel waren 5 µl der Plasmid-Probe ausreichend.

3.4. in vitro Rekombination

3.4.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen werden aus Prokaryonten isoliert und erkennen jeweils ganz spezifische Sequenzen (typischerweise 4 - 6 Nukleotide) auf der doppelsträngigen DNA (Roberts 1984). Die Typ 2-Nukleasen schneiden in ihrer Erkennungssequenz die DNA entweder symmetrisch unter Erzeugung von glatten oder asymmetrisch unter Bildung von kohäsiven Enden.

Der Restriktionsansatz (25 µl) wurde wie von Maniatis (1982) beschrieben angesetzt:

1,0 µg DNA
2,5 µl Restriktions-Puffer (10-fach konzentriert)
2-3 E Restriktionsendonuklease
ad 25 µl H_2O

Da die Restriktionsenzyme unterschiedliche Salzoptima zum Schneiden der DNA besitzen, wurden Restriktions-Puffer mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen verwendet (Puffer C-F). Die Inkubationszeit betrug bei 37°C eine Stunde. Die Reaktion wurde durch eine Phenolextraktion bzw. durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 10 Minuten gestoppt. Zur gelelektrophoretischen Analyse der Restriktionsprodukte wurden 6 µl Puffer I zugegeben und die DNA-Fragmente, wie im Abschnitt 3.5.1. beschrieben, mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Verwendung fanden die folgenden Restriktionsendonukleasen:

Tab.2: Restriktionsendonukleasen

Enzym	Erkennungssequenz auf der DNA	verwendeter Puffer	Bemerkungen
AccI	GT/AGAC, GT/ATAC GT/CGAC, GT/CTAC	C	(1)
BamHI	G/GATCC	E	(2)
BglI	GCCNNNN/NGGC	D	
ClaI	AT/CGAT	C	(1)
DdeI	C/TNAG	D	
EcoRI	G/AATTC	E	(2)
HindIII	A/AGCTT	D	
KpnI	GGTAC/C	C	(3)
NaeI	GCC/GGC	D	(4)
NsiI	ATGCA/T	E	(3)
PvuII	CAG/CTG	D	(4)
SmaI	CCC/GGG	F	(4)
TaqI	T/CGA	C	(5)

N entspricht A,T,G oder C.

(1) Obwohl die beiden Endonukleasen AccI und ClaI verschiedene Erkennungssequenzen besitzen, tragen die nach Spaltung entstehenden DNA-Fragmente in 25% der Fälle (AccI erkennt vier verschiedene DNA-Sequenzen) komplementäre Basensequenzen an den jeweils überstehenden 5´-Enden,so daß diese zur Basenpaarung fähig sind. Nach Ligation der kohäsiven Enden wird die DNA-Sequenz an der Verknüpfungsstelle von der Nuklease TaqI erkannt.

AccI 5´GT|CGAC 3´ 5´ATCGAT 3´ ClaI
CAGCTG TAGCTA

5´GTCGAT 3´ TaqI
CAGCTA

(2) Für die Restriktionsendonukleasen sind Nebenaktivitäten beschrieben (Poliski et al. 1975, Chirikjan und George 1981). Bei zu niedrigen Salzkonzentrationen oder bei zu hohem Glyceringehalt im Restriktionsansatz verändern die Enzyme die Spezifität für ihre Erkennungssequenz.

(3) Die Endonukleasen KpnI und NsiI erzeugen überhängende 3´-Enden.

(4) Die Endonukleasen NaeI, PvuII und SmaI erzeugen glatte Enden.

(5) Die Reaktionstemperatur für die Endonuklease TaqI lag bei 65°C.

3.4.2. Präparation von DNA-Fragmenten mit glatten Enden

Die meisten Restriktionsendonukleasen erzeugen DNA-Fragmente mit überstehenden, einzelsträngigen 5´-bzw.3´-Enden. Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I besitzt eine 5´-3´ Polymerase- und eine 3´-5´Exonuklease-Aktivität (Kornberg 1974). Daher werden durch dieses Enzym überstehende, einzelsträngige 5´-Enden mit Nukleotiden zum Doppelstrang aufsynthetisiert und überstehende, einzelsträngige 3´-Enden abgebaut.

Die Reaktion wurde im 20 µl-Ansatz durchgeführt (Maniatis 1982), der die folgenden Komponenten enthielt:

7 mM Tris-HCl, pH=7,6
7 mM $MgCl_2$
50 mM NaCl
1 mM DTT
je 250 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
1 µg DNA-Fragmente
0,5 E Klenow-Fragment der E.coli DNA-Polymerase I

Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur über 20 Minuten. Gestoppt wurde die Reaktion durch eine Phenolextraktion mit anschließender Isopropanolfällung.

3.4.3. Präparation von DNA-Einzelsträngen durch Exonuklease III

Die Exonuklease III von E.coli besitzt neben einer RNaseH-Aktivität auch eine 3´-Phosphatase- und eine doppelstrangspezifische 3´-5´ Exonuklease-Aktivität. Die letzteren beiden Eigenschaften können benutzt werden, um eine einzelsträngige DNA zu erzeugen (Richardson et al. 1964).
Der Reaktionsansatz (40 µl) enthielt folgende Komponenten (Yanish-Perron et al. 1985):

50 mM Tris-HCl, pH=8,0
1 mM DTT
5 mM $MgCl_2$
2 µg DNA
8 E Exonuklease III

Die Reaktion wurde bei 37°C mit variablen Zeiten durchgeführt und durch Phenolextraktion nebst Isopropanolfällung gestoppt.

3.4.4. Abbau von DNA-Einzelsträngen durch S1-Nuklease

Die S1-Nuklease von Aspergillus oryzae baut einzelsträngige DNA zu 5´-Mononukleotiden ab. Das pH-Optimum liegt bei 4,2 . Außerdem werden Zn^{2+} -Ionen für die Reaktion benötigt. Das Enzym greift aber keine doppelsträngige DNA bzw. RNA-DNA Hybride an (Vogt 1973, Berk und Sharp 1977).
Die Reaktionsbedingungen (10 µl-Ansatz) waren wie folgt (Maniatis 1982):

30 mM Natriumacetat (pH = 4,6)
50 mM NaCl
1 mM $ZnSO_4$
5 % (v/v)Glycerin
0,2 E S1-Nuklease
2 µg DNA

Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 20 Minuten. Gestoppt wurde die Reaktion durch Phenolextraktion und Isopropanolfällung.

3.4.5. Erzeugung von gerichteten Deletionen durch Exonuklease III und S1-Nuklease

Der Polylinker des Plasmids pUC18 (siehe Abb.2) wurde verwendet, um gerichtete Deletionen in der DNA zu erzeugen. Dazu wurde das Plasmid mit den beiden Restriktionsendonukleasen BamHI und KpnI geschnitten (vgl. Abschnitt 3.4.1.). Das Enzym BamHI erzeugt dabei ein überstehendes 5´-Ende, KpnI dagegen ein überstehendes 3´-Ende. Anschließend wurde die DNA mit der Exonuklease III von E.coli behandelt (vgl. Abschnitt 3.4.3.). Diese Nuklease baut doppelsträngige DNA vom 3´-Ende her zum Einzelstrang ab, kann also das freie 3´-Ende, das nach Restriktion mit dem Enzym KpnI als Einzelstrang überhängt, nicht abbauen. Folglich arbeitet das Enzym nur an dem 3´-Ende, das durch Spaltung der DNA mit dem Enzym BamHI erzeugt wurde, in Richtung auf die benachbarte HindIII-Schnittstelle zu (siehe Abb. 2). Auf diese Art ist die Reaktionsrichtung der Exonuklease III vorgegeben. Das Enzym erzeugt nur in dem DNA-Abschnitt Deletionen, der im Uhrzeigersinn rechts von der BamHI Erkennungssequenz liegt; also z.B. auch in DNA-Insertionen, die in die AccI Sequenz des Plasmids pUC18 kloniert worden sind. Durch Variation in der Inkubationszeit konnte die Länge des erzeugten DNA-Einzelstranges gesteuert werden. Dieser Einzelstrangbereich des Plasmids wurde nach Phenolextraktion (vgl. Abschnitt 3.1.2.) mit Hilfe der S1-Nuklease von Aspergillus oryzae abgebaut (vgl. Abschnitt 3.4.4.). Die DNA wurde danach phenolisiert, mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von E.coli behandelt (vgl. Abschnitt 3.4.2.), erneut phenolisiert und schließlich mit T4 DNA-Ligase zirkularisiert (vgl. Abschnitt 3.4.7.).

Mit der hier beschriebenen Methode lassen sich gerichtete Deletionen in der DNA induzieren, dagegen verläuft die Reaktion bei Verwendung der Nuklease Bal31 ungerichtet (Maniatis 1982).

3.4.6. Dephosphorylierung von DNA am 5´-Ende durch alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm spaltet endständige 5´-Phosphatgruppen ab (Efstratiadis et al. 1974). Diese Aktivität findet Verwendung bei der Klonierung von DNA-Fragmenten mit glatten Enden in einen geeigneten Vektor. Um die Rezirkularisation der Vektor-DNA während der Ligationsreaktion zu verhindern, wird die DNA mit alkalischer Phosphatase behandelt. Eine Ligation durch T4 DNA-Ligase ist dann nur noch möglich, wenn ein DNA-Fragment mit 5´-Phosphatenden insertiert wird.
Die Reaktion (50 µl) verlief unter folgenden Bedingungen (Maniatis, 1982):

50 mM Tris-HCl, pH=9,0
1 mM $MgCl_2$
0,1 mM $ZnCl_2$
1 mM Spermidin
10 pmol 5´ DNA-Enden
0,1 E alkalische Phosphatase

Die Inkubation erfolgte 30 Minuten bei 37°C und 30 Minuten bei 56°C. Beendet wurde die Reaktion durch eine dreifache Phenolextraktion mit anschließender Isopropanolfällung.

3.4.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4 DNA-Ligase eingesetzt.
Die Ligation von kohäsiven DNA-Enden verlief unter den folgenden Reaktionsbedingungen (Boehringer-Katalog 1983):

20 mM Tris-HCl, pH=7,6
10 mM $MgCl_2$
0,5 mM ATP
10 mM DTT
0,5 µM DNA-Fragmente
0,1 E T4 DNA-Ligase

Die Reaktion erfolgte für 3 Stunden bei 20°C oder über Nacht bei 10°C. Sollten DNA-Fragmente mit glatten Enden

ligiert werden, wurde 1 E T4 DNA-Ligase eingesetzt und 1 E T4 RNA-Ligase (Sugino et al. 1976). Die Inkubation erfolgte dann über Nacht bei 4°C. Der Ligationsansatz wurde anschließend 1:20 mit Puffer A verdünnt. Aliquots wurden bei der Transformation (vgl. Abschnitte 3.4.8. und 3.4.9.) eingesetzt.

3.4.8. Transformation von E.coli-Zellen

Die Transformation von E.coli-Zellen erfolgte in Anlehnung an die Methode von Hanahan (1983). Eine frische Übernachtkultur des jeweiligen Stammes wurde 1:30 mit TY-Medium verdünnt und in einem Erlenmeyerkolben des 10-fachen Volumens der Kultur unter guter Belüftung bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD_{600} von 0,5 wurden die Zellen abzentrifugiert (SS34-Rotor, 0°C, 5 Min., 6000 Upm) und in der Hälfte des Ausgangsvolumens der eiskalten Transformationslösung (Puffer G) suspendiert. Nach 15 Minuten auf Eis wurden sie erneut pelletiert und in einem Zehntel des Ausgangsvolumens suspendiert. Die Zellsuspension wurde nach weiteren 15 Minuten bei 0°C mit 60 µl DMSO vermischt. Pro Transformationsansatz wurden 200 µl dieser nunmehr kompetenten Zellen und 10 - 100 ng DNA gemischt und 45 Minuten bei 0°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock (90 Sekunden bei 45°C) wurde der Ansatz mit 1 ml TY-Medium versetzt und eine Stunde bei 37°C leicht geschüttelt. Nach dieser Zeit, in der die Zellen ihre durch die aufgenommene Plasmid-DNA kodierten Antibiotika-Resistenzen exprimieren konnten, wurden Aliquots der Bakterien nach Zugabe von 2,5 ml 45°C-warmem Top-Agar auf den jeweiligen Antibiotikaplatten ausplattiert. Diese Platten wurden bei 37°C im Brutschrank für 12 Stunden inkubiert. Die Transformationseffizienz lag in der Regel bei 10^6 Transformanten pro µg pBR322-DNA. Bei der Transformation des Stammes JM101 wurden zusätzlich 40µl 2 % (w/v) X-Gal und 40µl 0,1 M IPTG-Lösung in den Ansatz pipettiert. Eine Blaufärbung der ausplattierten Bakterienkolonien deutete darauf hin, daß die Bakterien in der Lage waren, Galaktose zu verwerten.

3.4.9. Transformation von B.subtilis-Zellen

Die Transformation erfolgte nach der Methode von Chang und Cohen (1979). 20 ml einer B.subtilis-Kultur(BR151 bzw. BD170) wurden in TY-Vollmedium bei 37°C auf eine Zelldichte von 1 x 10^8 Zellen pro ml angezogen. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet und in 1 ml 4 x Penassay broth (Difco) (70 g/l) und 1 ml 2 x SMM-Puffer (1 M Saccharose - 0,04 M Maleat - 0,04 M $MgCl_2$) resuspendiert. Nach der Zugabe von Lysozym (Endkonzentration 2 mg/ml) wurde die Zellsuspension 2 Stunden bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich B.subtilis-Protoplasten. Diese wurden vorsichtig abzentrifugiert (SS34-Rotor, 15 Min., R.T., 3000 Upm), in SMM-Puffer (x 1) gewaschen, erneut pelletiert und in 2 ml 4 x Penassay broth - 2 x SMM-Puffer resuspendiert. Der Transformationsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

1-5 µg DNA in 50 µl TE-Puffer
(10 mM Tris-HCl, pH=7,6 - 1 mM EDTA)
50 µl SMM-Puffer (x 2)
1,5 ml 40 % (w/v) PEG 6000 in 2 x SMM-Puffer
0,5 ml Protoplastensuspension

Der Ansatz wurde 2 Minuten lang leicht geschüttelt und danach mit 5 ml 4 x Penassay broth - 2 x SMM-Puffer verdünnt.Anschließend wurden die Protoplasten durch Zentrifugation vereinigt, im gleichen Puffer (1 ml) wieder suspendiert und 1,5 Stunden bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden dann auf DM3-Platten mit 10 µg/ml Chloramphenicol bzw. 5 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Pro µg DNA wurden gewöhnlich 10^5-10^6 Transformanten erhalten.

DM3-Regenerationsplatten enthalten:

200 ml 4 % (w/v) Agar
500 ml 1 M Natriumsuccinat
100 ml 5 % (w/v) Casamino-Acids (Difco)
50 ml 10 % (w/v) Hefeextrakt (Difco)
100 ml 3,5 % (w/v) K_2HPO_4- 1,5 % KH_2PO_4
25 ml 20 % (w/v) Glukose
20 ml 1 M $MgCl_2$
5 ml 2 % (w/v) BSA (sterilfiltriert)

3.4.10. Induktion des tac-Promotors durch IPTG

10 ml TY-Medium wurden mit 0,5 ml einer Übernachtkultur des betreffenden, plasmidhaltigen E.coli-Stammes angeimpft und mit 250 µl 1 M Mops-Lösung, 125 µl einer Thiamin-Lösung (2 mg/ml) 125 ml einer Thymin-Lösung (2 mg/ml) und 50 ml einer 40 % (w/v) Glukose-Lösung versetzt. Die Bakterien wurden in Gegenwart von 100 µg Ampicillin pro ml bis zu einer optischen Dichte von OD_{600} = 0,5 bei 37°C inkubiert. 5 ml der Kultur wurden abgenommen und mit 50 µl 100 mM IPTG versetzt. Beide Kulturen (mit und ohne IPTG) wurden anschließend 4 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die Zellproteine durch einen Zellschnellaufschluß gewonnen und durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert:
Dazu wurde die OD_{450}-Einheit der Zellkultur bestimmt. 2 ml der Kultur wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Zellen wurden in Probenpuffer (vgl. Abschnitt 3.5.2.) suspendiert (pro OD_{450}-Einheit 20 µl H_2O und 20 µl Probenpuffer x 2), 5 Minuten im Wasserbad gekocht und anschließend abzentrifugiert (SS34-Rotor, 20 Min., 4°C, 15.000 Upm). 5 bis 10 µl des Überstandes waren ausreichend für eine gelelektrophoretische Analyse der Zellproteine.

3.5.Gelelektrophorese

3.5.1. Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden überwiegend in 1%-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde die Agarose in Puffer H im Mikrowellenherd aufgekocht und anschließend auf etwa 70°C abgekühlt. Das Gel wurde als Flachgel (13 cm x 7 cm x 0,2 cm) gegossen. Das fertige Gel wurde mit Puffer H überschichtet und anschließend mit den DNA-Proben (DNA + 1/4 Volumen Puffer I) geladen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V. Die Laufzeit betrug 1 Stunde. Das Gel wurde anschließend 20 Minuten in einer Wanne mit Ethidiumbromid-Lösung (1µg/ml) gefärbt. Die unter dem UV-Licht (254 nm) sichtbaren DNA-Banden wurden mit einer Polaroid MP-4 Kamera (Rotfilter, Filmtyp 665) zur Dokumentation fotografiert. Dabei wurde ein Rotfilter der Firma B+W (Wiesbaden) benutzt. Um die Größe der DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese zu bestimmen, wurden DNA-Größenstandards verwendet. Dazu wurde entweder λ-DNA mit HindIII oder mit Hind III und EcoRI verdaut oder ØX174 RF-DNA mit HaeIII (BRL-Katalog 1983). Für eine Eichkurve wurde die Wanderungsstrecke der DNA-Fragmente in Abhängigkeit von dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes graphisch aufgetragen. Das Molekulargewicht unbekannter DNA-Fragmente konnte dann aus der Eichkurve abgelesen werden.

3.5.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung von Polypeptiden erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Vertikalgelen (0,2 cm x 10 cm x 15 cm) wie bei Lämmli (1970) beschrieben. Der Elektrophoresepuffer enthielt 0,19 M Glycin - 0,025 M Tris-Base, und 0,1 % SDS.

Proteinproben wurden mit einem Volumen Probenpuffer verdünnt aufgetragen. Der Probenpuffer (zweifach konzentriert) enthielt die folgenden Komponenten:

14,3 % (w/v) Glycerin
5,7 % (w/v) SDS
2,0 % 2'-Mercaptoethanol
0,09 M Tris-HCl (pH=6,8)
0,05 mg/ml Bromphenolblau

Das Gelsystem hatte folgende Zusammensetzung:

		Trenngel	Sammelgel
Acrylamid	% (w//v)	15,00	5,00
Bisacrylamid	% (w//v)	0,09	0,13
SDS	% (w//v)	0,10	0,10
Tris-HCl (pH=6,8)	M	--	0,125
Tris-HCl (pH=8,7)	M	0,375	--
Ammoniumpersulfat	% (w//v)	0,033	0,05
TEMED	% (w//v)	0,033	0,05

Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 150 V durchschnittlich 5 Stunden. Das Gel wurde anschliessend für 30 Minuten mit 25 % Isopropanol - 10 % Essigsäure - 0,25 % Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde mit 20 % Methanol - 7 % Essigsäure herausgewaschen.

3.5.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde nach der Methode von Danner (1982) durchgeführt:
Nach beendeter Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Abschnitt 3.5.1.) wurde das Gel mit den angefärbten DNA-Banden zurechtgeschnitten zwischen zwei Folien Chromatographie-Papier DE 81 gelegt, die mit Whatman 3MM-Papier bedeckt wurden. Diese wiederum wurden mit einem Schwamm überdeckt. Die Anordnung wurde durch zwei außen angelegte Plastikscheiben gehalten. Dieser Aufbau wurde in eine mit Elek-

trophorese-Puffer (1,44 % (w/v) Glycin - 0,3 % (w/v) Tris-Base) gefüllte Kammer gestellt. Bei einer angelegten Spannung von 45 V (350 mA) war der Transfer nach 35 - 45 Minuten beendet. Die Zeit richtete sich nach der Größe der DNA-Fragmente. Aus der DE 81-Folie wurde unter langwelligem UV-Licht die gewünschte Bande herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer L (1 mM EDTA - 10 mM Tris-HCl, pH=8,0 - 150 mM NaCl) wurde zum Eluieren der DNA der DE 81-Streifen mit Puffer M (1 mM EDTA - 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 - 1,5 M NaCl) überschichtet. Anschließend wurde der DE 81 Streifen mit der DNA 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde über silikonisierter Quarzwatte 30 Sekunden in einer Eppendorf-Zentrifuge bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die DNA wurde durch eine Isopropanolfällung (vgl. Abschnitt 3.1.3.) gewonnen und in Puffer A aufgenommen.

3.6. in vitro DNA-Synthese

3.6.1. Präparation eines zellfreien E.coli-Extraktes

Zellfreie Extrakte wurden nach Staudenbauer (1976) präpariert:

2 l TY-Medium wurden mit einer 20 ml Übernachtkultur des jeweiligen Stammes angeimpft. Die Bakterien wurden unter konstantem Schütteln bis zu einer OD_{600} von 1,0 wachsengelassen, im Eiswasserbad abgekühlt und dann abzentrifugiert (GS3-Rotor, 5 Min., 4°C, 8.000 Upm). Das Pellet wurde in ca. 20 ml Puffer J gewaschen, erneut abzentrifugiert (SS34-Rotor, 5 Min., 4°C, 12.000 Upm) und anschließend in Puffer J (1 ml pro g feuchte Zellen) resuspendiert. Die Ausbeute betrug ungefähr 3 g Zellen. Die Lyse der Zellen wurde durch Zugabe von 1/50 Volumen einer frisch angesetzten Lysozymlösung (16 mg/ml Lysozym - 50 mM EDTA) eingeleitet. Anschließend wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 10°C im Wasserbad wieder aufgetaut. Die lysierten Zellen wurden 30 Minuten bei 0°C inkubiert und bei 30.000 Upm im 45 Ti-Rotor abzentrifugiert. Der klare, gelbliche Überstand (Rohextrakt) hatte

eine Konzentration von 15 bis 25 mg Protein/ml.
Um restliche Nukleinsäuren zu entfernen, wurden dem Rohextrakt 1/10 Volumen einer frisch angesetzten 30%-igen (w/v) Streptomycinsulfatlösung tropfenweise zugegeben und 30 Minuten bei 0°C im Eiswasserbad gerührt. Der Niederschlag wurde im SS34-Rotor 20 Minuten bei 12.000 Upm und 2°C abzentrifugiert. Anschließend wurde eine Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt. Dabei wurden für eine 43%-ige Fällung (AS43) 0,28 g von neutralisiertem Ammoniumsulfat (10 g mit 50 µl 1 N KOH mörsern) pro ml Rohextrakt unter Rühren langsam zugesetzt (di Jeso 1963), 0,44 g AS/ml für eine 70%-ige (AS70). Danach wurde 30 Minuten weitergerührt und die ausgefällten Proteine abzentrifugiert (SS34-Rotor, 20 Min., 2°C, 12.000 Upm). Nach Waschen des Pellets mit kalter, gesättigter und neutralisierter Ammoniumsulfatlösung und erneuter Zentrifugation wurden die Proteine in etwa 300 µl Puffer J resuspendiert und 3 Stunden gegen 2 Liter desselben Puffers dialysiert. Die Ammoniumsulfatfraktion (AS 43) wurde in Aliquots von 100 µl aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Proteinkonzentration der AS43-Fraktion betrug 15 bis 25 mg/ml.

3.6.2. Präparation eines zellfreien B.subtilis-Extraktes

Die Präparation eines Rohextraktes aus dem Stamm B.subtilis BR151(pC194) verlief in Analogie zur Präparation eines E.coli-Extraktes (vgl. Abschnitt 3.6.1.). Im Unterschied zu dieser Präparation wurde die Lyse jedoch mit einer erhöhten Lysozym-Konzentration (Zugabe von 1/50 Volumen einer 30 mg/ml Lysozym - 50 mM EGTA-Lösung) durchgeführt. Außerdem wurde Puffer K verwendet, der die beiden Proteaseinhibitoren p-Aminobenzamidin und Phenylmethylsulfonylfluorid enthielt. Die Zellyse bei 0°C wurde auf einen Zeitraum von 2 Stunden ausgedehnt. Danach wurde die Salzkonzentration durch Zugabe von KCl auf 400 mM eingestellt, um die Replikationsproteine von der DNA abzulösen (Orr und Staudenbauer 1982). 30 Minuten später wurden 0.01 Volumen 10 % (w/v) Brij-Lösung und 0,2 Volumen einer 2 M KCl-Lö-

sung zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 45 Minuten bei 0°C verlief die weitere Präparation des B.subtilis-Extraktes gemäß der in Abschnitt 3.6.1 beschriebenen Aufarbeitung. Der Rohextrakt wurde zum Schluß für 2 x 4 Stunden gegen 4 l Puffer K dialysiert, um die Salzkonzentration wieder auf 50 mM einzustellen.

3.6.3. Messung der DNA-Synthese in vitro

Der Test diente zur Bestimmung der in vitro DNA-Synthese. Der Reaktionsansatz (25 µl) enthielt folgende Komponenten (Staudenbauer 1976, Diaz et al. 1981):

25 mM Hepes-KOH (pH=8,0)
50 mM KCl
11 mM Magnesiumacetat
15 mM Kreatinphosphat
0,1 mg/ml Kreatinkinase
2 mM ATP
0,4 mM CTP, GTP, UTP
0,05 mM cAMP
0,05 mM dATP, dGTP, dCTP, [^{3}H]-dTTP (500 cpm/pmol)
2,5 mM Spermidin
1 mM DTT
0,5-1,0 µg DNA

Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 bis 15 µl eines zellfreien Extraktes. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte über 60 Minuten bei 30°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 µl Alkali Stop-Mix (Schuster et al. 1975) gestoppt. Die DNA wurde mit 500 µl 2 M TCA im Eisbad 10 Minuten präzipitiert, der Niederschlag auf Nitrocellulosefiltern abfiltriert, dreimal mit 5%-iger TCA - 0,05 M $Na_4P_2O_7$-Lösung und einmal mit 2%-iger Essigsäure nachgewaschen. Zu den getrockneten Filtern wurden 5 ml Szintillatorlösung gegeben. Die Radioaktivität des Niederschlags wurde im Flüssigkeitsszintillator (Beckmann LS 7500) gemessen.

3.6.4. Analyse der Replikationsprodukte

Ein fünffacher Reaktionsansatz (125 µl) wurde gemäß Abschnitt 3.6.3. angesetzt. Dem Reaktionsgemisch wurde [^{35}S]-dCTP (10µC) statt [^{3}H]-dTTP zugesetzt. Nach 60 Minuten bei 30°C wurde die Probe mit Puffer A auf 400 µl verdünnt und mit einem Volumen Phenol gemischt. Durch kurze Zentrifugation in einer Epppendorf-Tischzentrifuge wurden die beiden Phasen getrennt. Die obere, wäßrige Phase wurde abgenommen und die Phenolextraktion wiederholt. Um restliches Phenol zu entfernen, wurde danach die wäßrige Phase zweimal mit je einem Volumen Ether ausgeschüttelt.Aus dieser Phase wurde die DNA durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol während 30 Minuten bei -70°C ausgefällt. Nach anschließender 30-minütiger Zentrifugation bei 12.000 Upm und 0°C im SS34-Rotor wurde das DNA-Pellet in 20 µl Puffer A resuspendiert und nach Zugabe von 5 µl Puffer I auf ein vertikales, 1%-iges Agarose-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese und das Anfärben der DNA-Banden erfolgte wie im Abschnitt 3.5.1. beschrieben. Danach wurde das Agarose-Gel unter Vakuum bei 60°C getrocknet. Ein Röntgenfilm (Kodak XR-5) wurde aufgelegt und nach 24 Stunden bei -70°C wurde das Autoradiogramm der radioaktiv markierten DNA-Banden entwickelt.

3.7 In vitro Proteinsynthese

Ein zellfreies, gekoppeltes Transkriptions/Translations-System für E.coli wurde 1973 von Zubay beschrieben. Das System ermöglicht in vitro die Expression von Genen , soweit sie die nötigen prokaryontischen Startsignale (z.B. Promotor für die Transkription, Ribosom-Bindungsstelle für die Translation, Aoyama et al. 1983, Shine und Dalgarno 1974, Gold et al. 1981) besitzen. Die Vorteile gegenüber den entsprechenden in vivo Methoden (Minizellen, Maxizellen, u.a.) liegen in einer effizienteren, radioaktiven Markierung der synthetisierten Proteine und in der damit möglichen Zuordnung von Proteinen zu bestimmten DNA-Fragmenten (Pratt et al. 1981).

Lösung A (200 µl) enthielt die folgenden Komponenten:

40 µmol Tris-Acetat (pH=8,0)
55 µmol Kaliumacetat
1,4 µmol DTT
27 µmol Ammoniumacetat
13 µmol Magnesiumacetat
je 0,25 µmol Aminosäure (außer Methionin)
0,025 µmol Methionin
100 µg/ml E.coli tRNA
27 µg/ml Folinsäure
27 µg/ml Flavin-Adenindinukleotid
27 µg/ml Pyridoxin-HCl
11 µg/ml p-Aminobenzoinsäure
2,2 µmol ATP (pH=7,0)
0,6 µmol CTP (pH=7,0)
0,6 µmol UTP (pH=7,0)
0,6 µmol GTP (pH=7,0)
21 µmol Phosphoenolpyruvat
7,0 µmol Calciumchlorid
16 mg/ml Polyethylenglykol 6000

Die Reaktion wurde im 30 µl-Ansatz durch Zugabe des S-30 Extraktes gestartet:

5,0 µl DNA (3µg in Puffer A)
10,5 µl Lösung A
2,0 µl L-[^{35}S]Methionin (20 µCi)
7,5 µl H_2O
5,0 µl S-30 Extrakt (aus E.coli MRE600, RNaseA$^-$)

Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion durch Abkühlen auf 0°C beendet. Zwischen 1 und 5 µl des Reaktionsansatzes wurden anschließend auf einem 15%-igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Abschnitt 3.4.2.). Als Größenstandards wurden [^{14}C]-markierte Proteine verwendet.

3.8. Darstellung von replikativen Intermediaten

3.8.1. Isolierung und Cross-Linking von replikativen Intermediaten

Zur Isolierung von replikativen Intermediaten des Plasmids pC194 wurde der B.subtilis Stamm BD170 verwendet. Der plasmidhaltige Stamm wurde in 2 l M9-Medium bei 37°C angezogen. Bei einer Zelldichte von 5 x 10^8 Zellen/ml wurde das Bakterienwachstum durch Zugabe von NaF (Endkonzentration: 0,1 M) gestoppt. Die Kultur wurde sofort in einem Trockeneis-Ethanol Bad eingefroren und anschließend bei 4°C aufgetaut. Die Bakterien wurden geerntet und wie in Abschnitt 3.3.2. beschrieben aufgearbeitet. Nach der CsCl-Gleichgewichtszentrifugation wurden die Fraktionen zwischen superhelikaler Plasmid-DNA und chromosomaler DNA, die auch offen zirkuläre Plasmid-DNA enthält, vereinigt. In diesen Fraktionen liegen die Replikationsintermediate vor (Eichenlaub et al. 1980, Stuitje et al. 1979, Scheer-Abramowitz et al.). Die weitere Aufarbeitung der DNA erfolgte wie in Abschnitt 3.3.2. beschrieben.

Ein Teil der isolierten DNA-Replikationsintermediate wurde einer photochemischen Reaktion mit 4,5´,8-Trimethylpsoralen (TMP) ausgesetzt. Psoralen und seine Derivate gehören zu einer Klasse von Substanzen, die in die DNA-Doppelhelix interkalieren und durch langwelliges UV-Licht kovalent an die Pyrimidine binden (Isaacs et al. 1977, Venema und Canosi 1980).

Die DNA-Replikationsintermediate (10 µg/ml in Puffer A) wurden mit 1/50 Volumen gesättigter TMP-Lösung in Ethanol versetzt. Nach 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur erfolgte die Bestrahlung bei 10°C in kleinen Petrischalen (Ø 3 cm) auf einem UV-Illuminator C-60 (UV-Products, Inc.) bei einer Wellenlänge von 366 nm. Nach Zeiten zwischen 1 und 20 Minuten wurden DNA-Proben entnommen und vor Licht geschützt auf Eis gestellt. Die tatsächliche Lichtintensität betrug 0,94 mW/cm^2 und wurde mit einem kalibrierten YS-1 Kettering Modell 65A Radiometer (Yellow Springs

Instrument Co.) gemessen. Die DNA wurde mit Isopropanol präzipitiert (vgl. Abschnitt 3.1.3.), in Puffer A aufgenommen und mit der Restriktionsendonuklease HindIII geschnitten. Dabei wurde die Reaktionszeit durch Verwendung der 10-fachen Enzymmenge auf 10 Minuten verkürzt.

3.8.2. Elektronenmikroskopische Untersuchung

Die geschnittene DNA wurde in einem 10 µl-Ansatz nach der Methode von Morris et al. (1975) gespreitet. Die Hyperphase enthielt:

2 µl DNA
2 µl 87 mM Na_2CO_3 - 8,7 mM EDTA
5 µl Formamid
1 µl 0,1 % Cytochrom C

5 µl der Hyperphase wurden über ein frisch gespaltenes Glimmerplättchen auf eine Wasseroberfläche (Hypophase) gespreitet. Von der Oberfläche wurden die gespreiteten Moleküle mit einem Parlodiumnetz aufgenommen, in Ethanol gewaschen, getrocknet und mit Platin/Palladium in einer Edwards-Bedampfungsanlage bedampft. Die Elektronenmikroskopie wurde mit dem Elektronenmikroskop EM301 der Firma Philips durchgeführt. Fotos von replikativen Intermediaten wurden bei 11.000-facher Vergrößerung aufgenommen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Klonierung des Cistron C des Plasmids pC194 in den Expressionsvektor pUC18

4.1.1. Strategie

Als Vektor für die Klonierung des offenen Leserasters C des Plasmids pC194 (Position 708 bis Position 1088, siehe Abb.1) wurde der E.coli Vektor pUC18 (siehe Abb.2) verwendet. Ziel der Klonierung war die Überexpression und Charakterisierung eines möglichen Genprodukts C, das nach Horinouchi und Weisblum (1982) an der Plasmidreplikation beteiligt sein könnte. Aus Tabelle 3 geht hervor, daß die Restriktionsendonuklease ClaI in den beiden Positionen 610 und 2278 schneidet. Dadurch entsteht ein 1668 Bp großes Fragment, welches das Leseraster C und das Chloramphenicol-Resistenzgen (Position 1260 bis 1907) enthält (C-Fragment). Das C-Fragment kann in die AccI-Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert werden, denn das Enzym AccI erkennt auf dessen Polylinker die Sequenz GT/CGAC (siehe Abb.2, Tab.2). Dieses DNA-Ende ist kompatibel mit den ClaI-Enden (AT/CGAT) des C-Fragmentes (siehe Tab.2, Anmerkung 1), so daß eine Ligation ermöglicht wird.

4.1.2. Klonierung des C-Fragmentes in den Vektor pUC18

Das Plasmid pUC18 wurde mit der Restriktionsendonuklease AccI linearisiert (siehe Abb.3, Spur c). Parallel dazu wurde das Plasmid pC194 mit der Nuklease ClaI geschnitten (siehe Spur e). Dabei entstanden zwei DNA-Fragmente mit 1668 Bp und 1238 Bp (siehe Tab.3, Abb.1). Da das C-Fragment (1668 Bp) das Chloramphenicol-Resistenzgen als Selektionsmarker trägt, wurde auf die vorherige Isolierung des C-Fragmentes verzichtet. Aus beiden Restriktionsansätzen wurde DNA entnommen und miteinander ligiert (vgl. Abschnitt 3.4.7.). Bei der Ligation (siehe Abb.3, Spur d) wurden die Spaltprodukte des Plasmids pC194 mit der Vektor-DNA verbunden. Dabei entstand rekombinante, hochmolekulare DNA; allerdings traten auch Produkte auf, die durch die Ligation der pC194-Fragmente untereinander entstanden

Tab.3: Restriktionsschnittstellen des Plasmids pC194

Name der Sequenz : pC194
untersuchte Region : 1- 2906

Enzym	Zahl	Position der gefundenen Schnittstellen
AccI	1	774,
BglI	1	963,
ClaI	2	610, 2278,
DdeI	4	161, 770, 808, 1420,
HindIII	1	2431,
MboI	2	1, 2001,
NaeI	1	968,
NsiI	2	109, 568,
PvuII	1	2746,

Die Position 0/2906 der DNA-Sequenz bezieht sich auf eine der MboI-Schittstellen des Plasmids pC194 und geht auf die publizierte DNA-Sequenz von Horinouchi und Weisblum (1982) mit der Korrektur von Dagert et al. (1984) zurück.
Die Tabelle wurde mit Hilfe des Rechenprogramms Nucdat von Isono auf einer Rechenanlage (DEC 2020) der Firma Digital Equipment Corporation erstellt.

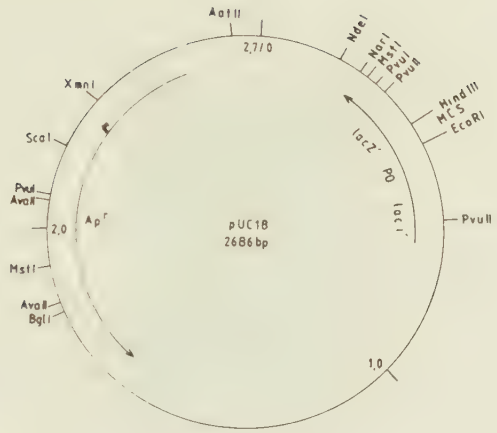

Abb.2: Restriktionskarte des Plasmids pUC18

Der Klonierungsvektor pUC18 ist ein Derivat des Plasmids pBR322 (Sutcliffe 1979), der das Ampicillin-Resistenzgen von pBR322 und die ß-Galaktosidase (lacZ) des lac-Operons von E.coli (Messing 1977) trägt. Die Lage der Restriktionsschnittstellen ergibt sich aus den Daten von Norrander (1983) und Yanish-Perron (1985).

lacZ´= Strukturgen für die ersten 145 Aminosäuren der ß-Galaktosidase
P = Promotor
O = Operator
laci´= Repressor
MCS = Polylinker (multiple cloning site)

Abb.2a: Herkunft des Klonierungsvektors pUC18

```
        SstI       SmaI        XbaI        PstI        HindIII
GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT
EcoRI      KpnI     BamHI       SalI        SphI
                                AccI
                               HincII
```

Das 2,7 kb große E.coli Plasmid pUC18 trägt den Polylinker des Phagenvektors M13mp18 (Norrander et al. 1983, Yanish-Perron et al. 1985), dessen DNA-Sequenz zwischen der EcoRI und der HindIII Restriktionsschnittstelle (siehe Abb.2) oben angegeben wurde. Das Plasmid enthält, basierend auf dem PvuII/EcoRI-Fragment des Plasmids pBR322, neben dessen Ampicillin-Resistenzgen, das HaeII-Fragment des E.coli lac-Operons einschließlich des lac-Promotors (Messing et al. 1977, Vieira und Messing 1982, Yanish-Perron et al. 1985). Dieses DNA-Segment kodiert für ein kurzes Polypeptid, welches in einem geeigneten Wirt (z.B. E.coli JM101, JM107 oder JM83) die Bildung von funktionsfähiger ß-Galaktosidase durch α-Komplementierung ermöglicht (Zinder und Boeke 1982). Dabei wird der lac^- -Phänotyp des Wirts in lac^+ umgewandelt. Diese Eigenschaft der Bakterien, Laktose zu verwerten, kann nach Induktion mit IPTG durch Zugabe von X-Gal (= 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-Galaktosid) als Substrat durch blaugefärbte Bakterienkolonien nachgewiesen werden. Dabei wird X-Gal in die entsprechende,blaue Indigoverbindung umgewandelt. Durch Insertion von DNA in eine der Restriktionsschnittstellen innerhalb des synthetischen Polylinkers, der vom Bakteriophagen M13mp18 stammt (Messing und Vieira 1982), kommt es zum Wachstum von weißen Bakterienkolonien (lac^-), da der Leseraster für das kurze Polypeptid unterbrochen wird. Die Suche nach rekombinanter DNA vereinfacht sich dadurch zu einer Selektion auf weißgefärbte Bakterienkolonien.

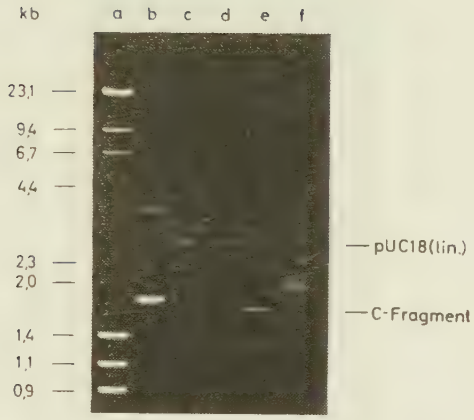

Abb.3: Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten und Ligationsprodukten (pUC18-C) in einem 1%-igen Agarose-Gel

a)λ-DNA + HindIII,ØX174 RF-DNA + HaeIII
b)pUC18 (cc-Form)
c)pUC18 + AccI (lineare Form / 2686 Bp)
d)Ligationsprodukte
e)pC194 + ClaI (C = 1668 Bp, 1238 Bp)
f)pC194 (stark relaxierte Formen)

Die Größenangaben der Restriktionsfragmente ergeben sich aus den publizierten DNA-Sequenzen von pUC18 (Norrander et al. 1983) und von pC194 (Horinouchi und Weisblum 1982).

waren. Mit diesem Ligationsgemisch wurde der E.coli Stamm JM101 transformiert (vgl. Abschnitt 3.4.8.). Die Selektion erfolgte dabei über die Ampicillin-Resistenz des Vektors und über die Chloramphenicol-Resistenz des C-Fragmentes. Durch Zugabe von IPTG und X-Gal zum Transformationsansatz konnte zwischen lac^+ und lac^- Phänotyp differenziert werden. Die Transformationseffizienz lag bei $2X10^3$ Transformanten/µg DNA. Bei der doppelten Selektion auf Ampicillin und Chloramphenicol-Resistenz besaßen erwartungsgemäß alle Bakterienklone rekombinante Plasmide mit einem lac^- Phänotyp. Aus acht Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert (vgl. Abschnitt 3.3.3.), die durch die Endonuklease EcoRI linearisiert (vgl. Abschnitt 3.4.1.) wurde. Die Restriktionsfragmente wurden auf einem 1%-igen Agarose-Gel aufgetrennt (siehe Abb.4, Spuren f-i). Alle untersuchten Plasmide zeigten eine einzige Bande von 4,4 kb. Dies entsprach dem vorher berechneten Wert von 4354 Bp für die rekombinante DNA, der sich aus der Größe des Vektors von 2686 Bp (siehe Abb.2) und der des C-Fragmentes von 1668 Bp (siehe Tab.3) zusammensetzt. Außerdem wurde durch Restriktion mit den Enzymen AccI und EcoRI die relative Orientierung des C-Fragmentes im Verhältnis zum Vektor bestimmt (siehe Spuren a-d). Dabei stammt die EcoRI-Schnittstelle aus dem Polylinker des Vektors pUC18 (siehe Abb.2) und die AccI-Schnittstelle aus dem C-Fragment (siehe Tab.3 und Abb.1). Es gibt zwei Möglichkeiten der Anordnung des C-Fragmentes zur pUC18-DNA. Im Fall A entstehen nach der Restriktion zwei DNA-Fragmente der Größe 4190 Bp und 164 Bp; im Fall B entstehen zwei Fragmente mit 2850 Bp und 1504 Bp. Von acht untersuchten Plasmiden besaßen zwei die in Abb.5 gezeigte Orientierung A (siehe Abb.4, Spur d), in den sechs übrigen Plasmiden lag das C-Fragment in der umgekehrten Orientierung B vor (siehe Abb.4, Spuren a-c). Von den zwei Bakterienklonen, die die rekombinanten Plasmide pGB400 und pGB408 (siehe Abb. 5) enthielten, wurde gemäß Abschnitt 3.3.1. DNA isoliert, die für die Erzeugung von Deletionsmutanten benutzt wurde (vgl. Abschnitt 4.1.3.).

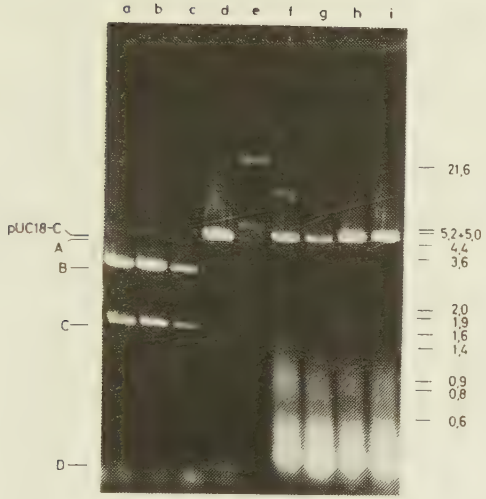

Abb.4: Restriktionsanalyse von rekombinanter DNA (pUC18-C) mit EcoRI und AccI im 1%-igen Agarose-Gel

a)pGB403 + EcoRI + AccI (B = 2850 Bp, C = 1504 Bp)
b)pGB402 + EcoRI + AccI (B = 2850 Bp, C = 1504 Bp)
c)pGB401 + EcoRI + AccI (B = 2850 Bp, C = 1504 Bp)
d)pGB400 + EcoRI + AccI (A = 4190 Bp, D = 164 Bp)
e)λ-DNA + EcoRI + HindIII
f)pGB403 + EcoRI (lineare Form / 4354 Bp)
g)pGB402 + EcoRI (lineare Form / 4354 Bp)
h)pGB401 + EcoRI (lineare Form / 4354 Bp)
i)pGB400 + EcoRI (lineare Form / 4354 Bp)

Die Fragmentgröße errechnet sich aus den DNA-Sequenzen des Plasmids pUC18 (Yanish-Perron 1984) und pC194 (Horinouchi 1982)

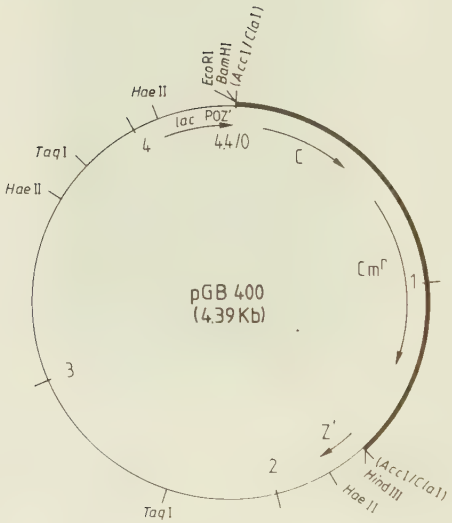

Abb.5: Restriktionskarte des Plasmids pGB400
Aus Abb. 4 (Spur d) ergibt sich die hier gezeigte Anordnung (Orientierung A) vom C-Fragment von pC194 (▬) zur pUC18-DNA (▭).

Da in den Plasmiden mit der Orientierung A der tac-Promotor dieselbe Richtung wie der C-Leserahmen aufweist, wurde diese DNA im Zubay-System eingesetzt (vgl. Abschnitt 3.7). Dabei konnte keine Expression eines Genprodukts C nachgewiesen. Es wurde kein Protein gefunden, das nach Induktion des lac-Promotors mit IPTG verstärkt synthetisiert wurde und ein Molekulargewicht von ca. 15.000 d aufwies (Daten nicht gezeigt).

4.1.3. Konstruktion von Deletionsmutanten des Plasmids pGB400

Wie aus Abb.5 hervorgeht wurde der C-Leseraster in das Plasmid pUC18 derartig kloniert, daß zwischen dem lac-Promotor des Vektors pUC18 und dem möglichen Startcodon des Leserahmen C (Position 708, siehe Abb.1) circa 150 Basenpaare liegen. Um eine eventuelle Regulation der Transkription (Platt 1981, Holmes et al. 1983) über den C-eigenen Promotor, der in diesem Bereich liegen könnte, auszuschalten, wurden verschieden große Deletionen in diese DNA-Sequenz eingeführt. Dazu wurde die Plasmid-DNA wie in Abschnitt 3.4.5. beschrieben behandelt:
Das Plasmid pGB400 (siehe Abb.5) wurde mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und BamHI geschnitten und danach vom BamHI-Ende her durch Exonuklease III in Richtung auf das C-Fragment abgebaut. Dabei liegt die KpnI-Schnittstelle im Polylinker des Plasmids pUC18 zwischen der EcoRI und der BamHI-Schnittstelle (vgl. Abb.2). Die Reaktion wurde nach unterschiedlichen Zeiten beendet, so daß verschieden große Deletionen auftraten. Die übriggebliebenen DNA-Einzelstränge wurden durch das Enzym S1-Nuklease abverdaut. Nach Auffüllen der DNA durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I mit Desoxyribonukleosid-Monophosphaten wurde das DNA-Gemisch durch T4 DNA-Ligase zirkularisiert. Der E.coli Stamm JM107 wurde mit dem Ligationsansatz transformiert (vgl. Abschnitt 3.4.8.) und auf Ampicillin/Chloramphenicolplatten ausplattiert. Dabei lag die Transformationseffizienz mit 10^4 Transformanten/µg DNA relativ hoch.

Insgesamt wurde DNA von 200 Klonen isoliert (vgl. Abschnitt 3.3.1.) und analysiert. Die Plasmide wurden mit den Endonukleasen EcoRI und HindIII geschnitten (vgl. Abschnitt 3.4.1.), wobei die in den Vektor pUC18 insertierte DNA wieder herausgeschnitten wurde (vgl. Abb.2). Die gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente sind in Abbildung 6 zu sehen. Alle analysierten Plasmide wiesen mehr oder weniger große Deletionen im C-Fragment auf (vgl. Spuren a-c,i,k,m mit Spur h), dagegen traten erwartungsgemäß keine Deletionen im Vektor-Anteil auf. In der DNA der Spuren d-g kam allerdings auch eine Deletion der EcoRI-Schnittstelle des Vektors vor. Diese Reaktion kann auftreten wenn die Endonuklease KpnI unvollständig schneidet. Anhand der Größenstandards (siehe Spur j) konnte die Größe der Deletionen annähernd bestimmt werden. Plasmide, deren Insertion zwischen 1668 Bp (Größe des C-Fragmentes) und 1550 Bp (entspricht einer Deletion von ca. 100 Bp im C-Fragment) lag (siehe Spuren a-c,i,k,m), wurden auf die Expression eines hypothetischen Genprodukts C getestet. Dazu wurden 42 Plasmide in das Zubay-System (vgl. Abschnitt 3.7.) eingesetzt. In keinem Fall konnte durch Induktion des lac-Promotors eine Proteinexpression nachgewiesen werden, die einem C-Protein von ca. 15.000 d entsprechen würde (Daten nicht gezeigt).

4.2. Klonierung und Expression des RepH-Gens des Plasmids pC194 in den Expressionsvektor pJF118(E,H)

4.2.1. Strategie

Als Expressionsvektor für die Klonierung des offenen Leserasters A des Plasmids pC194 (siehe Abb.1) wurde der 5,3 kb große E.coli Vektor pJF118(E,H) (siehe Abb.7) verwendet. Der Vektor ist ein Derivat des Plasmids pBR322 (Lanka, Fürste, persönl. Mitteilung), besitzt dessen Ampicillin-Resistenzgen und den tac-Promotor des Plasmids pKK84-1 (Amann et al. 1983). Dieser tac-Promotor wurde in vitro aus der -35 Sequenz (Maniatis et al. 1975, Gilbert 1976) des trp-Promotors und der -10 Sequenz (Pribnow 1975,

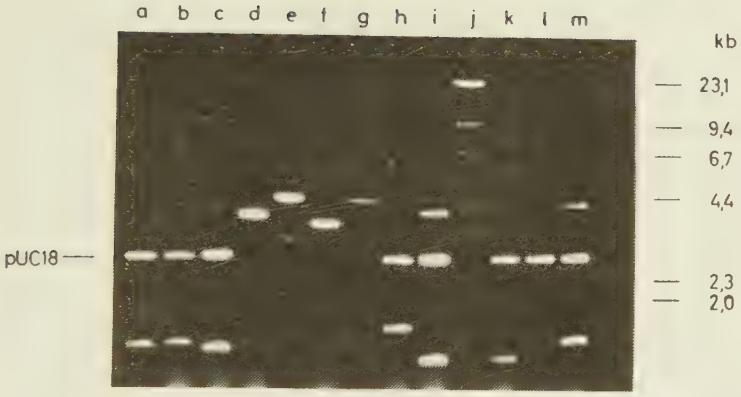

Abb.6: Bestimmung der Größe von Deletionen im Plasmid pGB400 durch Spaltung der DNA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII

Der Ausgangspunkt der Deletionen liegt in der BamHI-Schnittstelle des Plasmids pGB400 (siehe Abb.5). Die Deletionen reichen unterschiedlich weit in das C-Fragment hinein. Die Auftrennung der DNA-Banden erfolgte in einem 1%-igen Agarose-Gel.

a)-g) pGB450 - pGB456 + EcoRI + HindIII

h) pGB400 + EcoRI + HindIII

i) pGB457 + EcoRI + HindIII

j) λ-DNA + HindIII

k)-m) pGB458 - pGB460 + EcoRI + HindIII

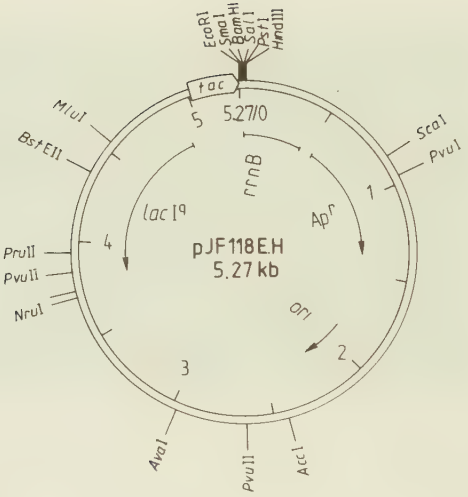

Abb.7: Restriktionskarte des Plasmids pJF118(E,H)

Das Plasmid pJF118(E,H) leitet sich vom E.coli-Plasmid pBR322 ab und trägt neben dem tac-Promotor (Amann et al. 1982) auch das Gen für den Repressor des lac-Operons ($lacI^q$).

Hinter dem tac-Promotor befindet sich der Polylinker des Vektors M13mp8 (Messing und Vieira 1982)

Ap^r = Ampicillin-Resistenzgen

rrnB = Terminatoren der Transkription

tac = tac-Promotor

Schaller et al. 1975) nebst Ribosombindungsstelle (Shine und Dalgarno 1974) des lacUV5 Promotors konstruiert (deBoer et al. 1982, Amann et al. 1983). Der tac-Promotor besitzt damit die optimalen Startsignale zum Transkriptionsstart durch die RNA-Polymerase von E.coli (Rosenberg und Court 1979, Siebenlist et al. 1980) und gehört damit zu den stärksten Promotoren in diesem Bakterium. Die Consensus`Sequenz lautet: ..TTGACA.. ..TATAAT.. .
Der tac-Promotor wird durch den lac Repressor ($lacI^q$)reprimiert, der ebenfalls auf dem Plasmid pJF118(E,H) kodiert. Durch Zugabe von IPTG kann der lac-Repressor inhibiert und die Transkription über den tac-Promotor induziert werden. Hinter dem tac-Promotor liegt ein ´Polylinker´, eine synthetisch konstruierte DNA-Sequenz, auf der Erkennungsequenzen für Restriktionsendonukleasen (EcoRI, SmaI, BamHI, SalI, PstI, HindIII) liegen, die nur einmal auf der gesamten Plasmid-DNA vorkommen und damit zur gezielten Insertion von DNA-Fragmenten geeignet sind. Die synthetische Sequenz stammt aus dem Phagenvektor M13mp18 (Norrander et al. 1983, Yanish-Perron et al. 1985). Daran schließt sich ein Genabschnitt mit Transkriptionsterminatoren (rrnB) an (Brosius et al. 1981), um eine mögliche Interferenz der Transkription mit der Plasmidreplikation zu verhindern (Gentz et al. 1981). Die Konstruktion des Vektors ermöglicht es, durch Klonierung in eine der oben genannten Restriktionsschnittstellen ein DNA-Fragment zwischen tac-Promotor und Transkriptionsterminatoren zu insertieren. Dabei kann durch Restriktion mit zwei verschiedenen Endonukleasen eindeutig die Orientierung der Insertion festgelegt werden, indem sowohl der Expressionsvektor als auch das zu insertierende DNA-Fragment mit diesen Enzymen geschnitten werden (Messing und Vieira 1982). Außerdem kann in die Restriktionsschnittstelle von SmaI bzw. HincII jede DNA mit glatten Enden kloniert werden. Diese Insertion kann anschließend mit Hilfe der benachbarten Restriktionsschnittstellen (z.B. EcoRI und HindIII, vgl. Abb.7) auch wieder ausgeschnitten werden. Ein entscheiden-

der Vorteil des gesamten Klonierungssystems besteht in der Regulierbarkeit des Promotors, so daß auch Gene kloniert werden können deren Genprodukte eine schädliche Auswirkung auf das Wachstum der Wirtszellen besitzen.

In dieser Klonierung sollte das offene Leseraster A des Plasmids pC194 in die SmaI-Schnittstelle des E.coli Expressionsvektors pJF118(E,H) kloniert werden, um eine Überexpression des entsprechenden Genprodukts A zu erzielen. Der Leserahmen A und dessen nähere Umgebung wurde in Abb.8 schematisiert dargestellt. Anhand der Ergebnisse von Horinouchi und Weisblum (1982) und von Dagert et al. (1984) konnte durch Computeranalyse das Plasmid pC194 auf Restriktionsschnittstellen verschiedener Endonukleasen untersucht werden. Dabei fand das Programm Nucdat von Isono (persönl. Mitteilung) auf einem DEC 2020 Rechner der Firma Digital Equipment Corporation Verwendung. Die Ergebnisse für einige Enzyme wurden in Tabelle 3 zusammengefaßt.
Zur Klonierung wurde allerdings nicht das Plasmid pC194 selbst verwendet sondern das Hybridplasmid pHV14 (siehe Abb.9), das sowohl in B.subtilis über seinen pC194-Anteil als auch in E.coli über seinen pBR322-Anteil replizieren kann (Goze und Ehrlich 1980).

4.2.2. Klonierung des RepH-Gens

DNA des Vektors pJF118(E,H) wurde wie im Abschnitt 3.4.1. beschrieben mit der Restriktionsendonuklease SmaI geschnitten. Anschließend wurden die 5´-Phosphatgruppen der glatten DNA-Enden durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (vgl. Abschnitt 3.4.6.) entfernt, um eine Zirkularisation der Vektor-DNA bei einer Ligationsreaktion zu vermeiden. Diese DNA wurde phenolisiert (vgl. Abschnitt 3.1.2.) und im Agarose-Gel überprüft (siehe Abb.10, Spur b). Aliquots der DNA wurden zur Klonierung von DNA-Fragmenten mit glatten Enden verwendet.

In einem ersten Versuch wurde das Plasmid pHV14 mit den Nukleasen BglI (Position 963, siehe Abb.8), HindIII (Position 2431) und PvuII (Position 2746) geschnitten (vgl. Ab-

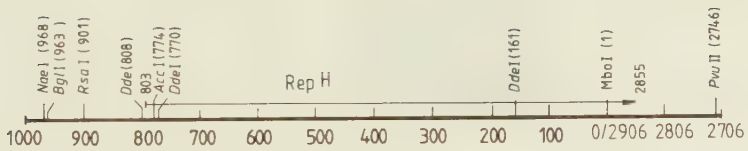

Abb.8: Restriktionskarte des RepH-Gens von pC194
Die Abbildung zeigt den Leseraster A des Plasmids pC194, der für das RepH-Protein kodiert, zusammen mit den wichtigsten Restriktionsschnittstellen (nach Horinouchi 1982).

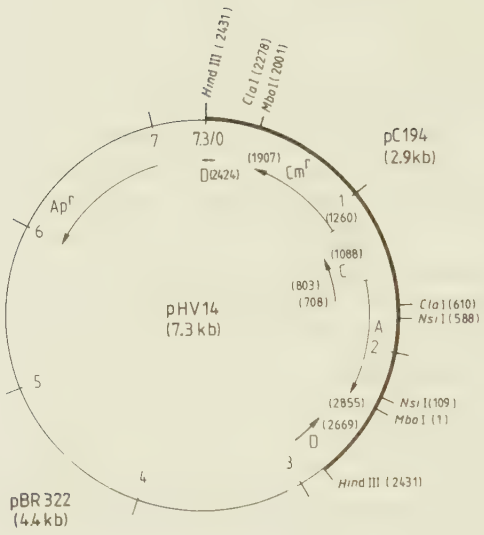

Abb.9: Restriktionskarte des Plasmids pHV14

Das Hybridplasmid pHV14 setzt sich zusammen aus dem S.aureus-Plasmid pC194 (—) und dem E.coli-Plasmid pBR322 (-) ,die über ihre HindIII-Schnittstelle miteinander verbunden sind (Goze 1980). Das Plasmid exprimiert Resistenzen gegen Ampicillin (Ap^r) und gegen Chloramphenicol (Cm^r). Die Lage der Schnittstellen beruht auf der Arbeit von Horinouchi (1982) und ist für das Plasmid pC194 berechnet. Zusätzlich sind die vier offenen Leseraster des Plasmids pC194 (A-D) eingezeichnet.

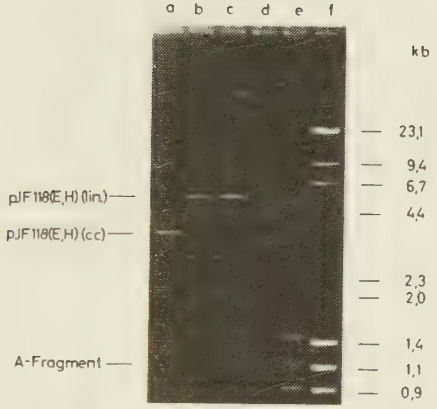

Abb.10: Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten und Ligationsprodukten (pJF118-A) in einem 1,5%-igen Agarose-Gel

a)pJF118(E,H)

b)pJF118(E,H) + SmaI + Alkalische Phosphatase

c)Ligationsprodukte

d)A-Fragment

e)pC194 + HindIII + BglI + PvuII

f)λ-DNA + HindIII,ØX174 RF-DNA + HaeIII

schnitt 3.4.1.). Dabei bezieht sich die Angabe der Position auf die Nummerierung des Plasmids pC194 (siehe Abb.1,3 und Tab.3). Bei der Reaktion entstanden DNA-Fragment mit den folgenden Größen (berechnet aus Abb.1 und Tab.3,4):
aus dem pC194-Anteil : 315, 1123, 1468 Bp
aus dem pBR322-Anteil: 234, 899, 903, 914, 1416 Bp.
Das DNA-Fragment mit der Größe 1123 Bp enthält den gesuchten Leseraster A und wurde als A-Fragment gekennzeichnet. Der gesamte Restriktionsansatz wurde auf einem 1,5%-igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Abschnitt 3.5.1.). Die Verwendung der Restriktionsendonuklease HindIII ermöglichte eine bessere Trennung des gesuchten A-Fragmentes von den übrigen DNA-Fragmenten bei der Gelelektrophorese. In Abb.10 (Spur e) sind allerdings nur drei DNA-Banden sichtbar:
1. eine Doppelbande bestehend aus den 1468 und 1416 Bp grossen DNA-Fragmenten, die in dem 1,5%-igen Agarose-Gel kaum getrennt wurden;
2. das A-Fragment (1123 Bp), das durch Vergleich mit den DNA-Größenstandards leicht zu identifizieren war (vgl. Spur e mit Spur f);
3. eine Dreifachbande mit DNA der Größen 914, 903 und 899 Bp.
Das A-Fragment wurde anschließend wie in Abschnitt 3.5.3. beschrieben aus dem Gel isoliert. Es enthält allerdings nur auf der einer Seite durch den Schnitt mit PvuII ein glattes Ende; auf der anderen Seite entsteht durch die Restriktion mit BglI ein überstehendes 3'-Ende. Deshalb wurde das A-Fragment mit Nukleotiden durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt (vgl. Abschnitt 3.4.2.). Dieses A-Fragment mit glatten DNA-Enden (siehe Abb.10, Spur d) wurde mit dem SmaI-geschnittenen Vektor pJF118(E,H) (siehe Spur b) ligiert (vgl. Abschnitt 3.4.7). Als Ligationskontrolle wurde ein Aliquot des Reaktionsansatzes in Spur c aufgetragen. Bei der Ligation verschwindet die Bande des A-Fragmentes weitgehend, und es treten

Tab.4: Restriktionsschnittstellen des Plasmids pBR322

Name der Sequenz : pBR322
untersuchte Region : 1- 4366

Enzym	Zahl	Position der gefundenen Schnittstellen
AccI	2	652, 2247,
BglI	3	930, 1164, 3483,
ClaI	1	25,
DdeI	8	1582, 1744, 2286, 2751, 3160, 3326, 3866, 4292,
HindIII	1	31,
MboI	22	351, 378, 469, 827, 1099, 1130, 1145, 1462, 1669, 3043, 3118, 3129, 3137, 3215, 3227, 3332, 3673, 3691, 3737, 3995, 4012, 4048,
NaeI	4	403, 770, 930, 1284,
PvuII	1	2067,

Für das Enzym NsiI wurde keine Schnittstelle gefunden. Die DNA-Sequenz des Plasmids pBR322 wurde von Sutcliffe (1979) bestimmt. Die Position 0/4366 der Sequenz bezieht sich auf die EcoRI Schnittstelle des Plasmids.
Die Tabelle wurde mit Hilfe des Programms Nucdat von Isono auf einer Rechenanlage (DEC 2020) der Firma Digital Equipment Corporation erstellt.

höhermolekulare Ligationsprodukte auf (vgl. Spur d mit Spur c). Der Ligationsansatz wurde anschließend mit SmaI nachgeschnitten (vgl. Abschnitt 3.4.1.), um Vektormoleküle, die trotz Behandlung mit alkalischer Phosphatase zirkularisierten, erneut zu linearisieren. Im Gegensatz zum Vektor, bei dem eine SmaI Erkennungssequenz rekonstituiert wurde, waren die rekombinanten Moleküle resistent gegen eine Restriktion mit SmaI. Denn sowohl das durch das Enzym PvuII erzeugte DNA-Ende als auch das durch BglI enstandene und anschließend mit Klenow-Fragment behandelte können zwar mit den SmaI-Enden der Vektor-DNA ligieren; sie können aber keine neue SmaI-Erkennungssequenz rekonstituieren (siehe in Tab.2 unter BglI, PvuII und SmaI).

Mit dem Ligationsgemisch wurden anschließend E.coli Zellen HB101 transformiert (vgl. Abschnitt 3.4.8.). Die Transformationseffizienz lag mit 10^2 Transformanten pro µg DNA sehr niedrig. Die Selektion erfolgte über die Expression des Ampicillin-Resistenzgens auf Anwesenheit von Vektor-DNA. Eine weitergehende Selektion auf rekombinante Plasmide war mit diesem Klonierungssystem leider nicht möglich. Deshalb erfolgte die Identifizierung von rekombinanten DNA-Molekülen über die Isolierung von Plasmid-DNA aus 5 ml-Kulturen verschiedener Bakterienklone (vgl. Abschnitt 3.3.3.). Die Plasmid-DNA wurde mit dem Enzym EcoRI linearisiert und im 1%-igen Agarose-Gel elektrophoretisch analysiert (vgl. Abschnitt 3.4.1., 3.5.1.). Wie in Abb.11 gezeigt gab es trotz des Nachschneidens mit der Endonuklease SmaI verhältnismäßig viele Klone, die nur Vektor-DNA enthielten (siehe Spuren a,c,d). Ungefähr 20% aller untersuchten Bakterienklone enthielten Plasmide mit einer Insertion (siehe Spuren b,f). Außerdem traten in 16% der Fälle auch Deletionen auf (siehe Spuren e,h).

Die rekombinanten Plasmide wurden einer weitergehenden Restriktionsanalyse unterworfen. Abb.12 zeigt die Restriktionsmuster des Plasmids pGB716 mit verschiedenen Endonukleasen. In Spur e wurde das ungeschnittene Plasmid pGB716 aufgetragen, das als superhelikale, getwistete cc-Form

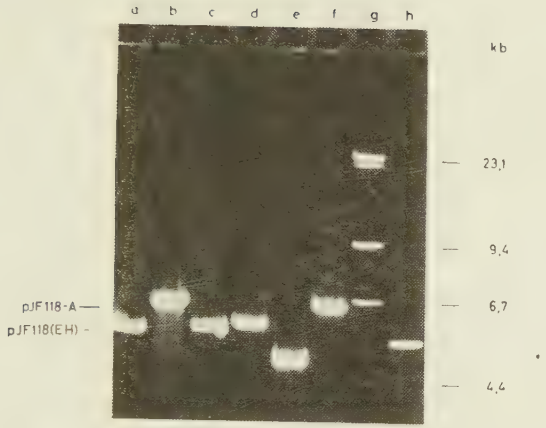

Abb.11: Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA (pJF118-A) mit EcoRI in einem 1%-igen Agarose-Gel

a)pGB711
b)pGB712
c)pGB713
d)pGB714
e)pGB715
f)pGB716
g)λ-DNA + HindIII,ØX174 RF-DNA + HaeIII
h)pGB717

vorliegt. Im Vergleich dazu zeigt Spur d die mit EcoRI linearisierte Form des Plasmids (6,4 kb). Durch die Restriktion der DNA mit EcoRI und HindIII (siehe Spur c) wurde das insertierte DNA-Fragment wieder herausgeschnitten (vgl. die Schnittstellen für SmaI, EcoRI und HindIII in Abb.7). Daher wurden zwei DNA-Banden sichtbar: a) der Vektor pJF118(E,H) (B = 5,3kb) und b) die Insertion - das A-Fragment (E=1123 Bp). In Spur b wurde durch Restriktion mit EcoRI und ClaI die Orientierung des A-Fragmentes im Verhältnis zum Vektor bestimmt. Wie aus Abb.7 hervorgeht stammt die EcoRI-Schnittstelle aus dem Vektor, dagegen gehört die ClaI-Erkennungssequenz zum insertierten A-Fragment (siehe Tab.3). Aus dem bekannten Restriktionsmuster des Plasmids pC194 konnte die Größe der beiden erwarteten DNA-Fragmente für beide Orientierungen berechnet werden. In der Orientierung A entstehen Fragmente mit 353 Bp und 6043 Bp. Mit diesen theoretisch vorhergesagten Werten stimmen die praktisch ermittelten überein (vgl. in Abb.12 Spur b mit Spur f): Eine DNA-Bande (A) der Größe 6,0 kb ist sichtbar. Dagegen ist das 353 Bp kleine Fragment aus dem Agarose-Gel herausgelaufen. Läge andererseits das A-Fragment in der umgekehrten Orientierung B im rekombinanten Plasmid pGB716 vor, würde die Restriktion mit EcoRI und ClaI zu zwei DNA-Fragmenten mit den Größen von 770 Bp und 5,6 kb führen. Die Ergebnisse aus Spur b deuten demnach auf die Orientierung A des A-Fragmentes zur Vektor-DNA hin. Die gefundene Orientierung wurde noch durch die Restriktion mit der Endonuklease AccI (siehe Spur a) bestätigt. Dabei liegt eine AccI-Schnittstelle im A-Fragment (siehe Tab.3), die zweite liegt im pBR322-Anteil der Vektor-DNA (siehe Abb.7), und die dritte liegt im Polylinker des Plasmids pJF118(E,H) und ist als SalI-Schnittstelle ausgewiesen. Denn das Enzym SalI erkennt die DNA-Sequenz G/TCGAC, die auch von AccI geschnitten wird (vgl. Tab.2). Bei der Reaktion entstanden drei DNA-Fragmente der Größen F=0,9kb,D=2,4kb und C=3,2kb (Abb.12, Spur a,f), die mit den theoretisch errechneten Werten von 934 Bp, 2,3 kb und

Abb.12: Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA pGB716 in einem 1%-igen Agarose-Gel

a)pGB716 + AccI (C = 3,2 kb, D = 2,3 kb, F = 0,9 kb)

b)pGB716 + EcoRI + ClaI (A = 6,0 kb)

c)pGB716 + EcoRI + HindIII (B = 5,3 kb, E = 1,1 kb)

d)pGB716 + EcoRI (6,4 kb)

e)pGB716

f)λ-DNA + EcoRI

Die in Klammern angegebene Größe der Restriktionsfragmente errechnet sich aus den publizierten DNA-Sequenzen von pC194 (Horinouchi 1982) und von pBR322 (Sutcliffe 1979).

3,2 kb (siehe Tab.3,4) sehr gut übereinstimmen. Bei der Orientierung B des A-Fragmentes zur Vektor-DNA wären dagegen die folgenden Fragmente entstanden: 0,2 kb, 2,3 kb und 4,0 kb. Aus den gezeigten Ergebnissen (siehe Spuren a,b) konnte die Restriktionskarte des Plasmids pGB716 mit der in Abb.13 gezeigten Orientierung A von Insert zum Vektor erstellt werden.
20 Bakterienstämme mit rekombinanten Plasmiden wurden auf eine Expression des Genprodukts A hin überprüft. Dazu wurden wie in Abschnitt 3.4.10 beschrieben Zellschnellaufschlüsse der jeweiligen plasmidhaltigen Bakterienklone im Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch untersucht. In keinem Fall konnte nach Induktion mit IPTG die Zunahme einer Proteinbande beobachtet werden, die dem Molekulargewicht des Genprodukts A (ca. 34.000 d) entsprechen könnte (siehe Abb.18, Spuren h-k).

Um eine nachweisbare Proteinexpression zu erzielen, wurde in einem zweiten Klonierungsansatz versucht, die ersten 155 Bp des A-Fragmentes, die vor dem Leseraster A liegen (siehe Abb.8, BglI (Position 963) bis DdeI (Position 808)), zu entfernen. Die Vermutung lag nahe, daß auf diesem DNA-Abschnitt, der starke Sekundärstrukturen aufwies, ein Transkriptions-Terminator (Platt 1981, Holmes et al. 1983) liegen könnte. Das kleinere, 968 Bp große A1-Fragment wurde durch partielle Spaltung des A-Fragmentes mit der Restriktionsendonuklease DdeI erhalten. In Abb.14 wurden die Spaltprodukte einer derartigen zeitlich begrenzten Restriktion in einem 2%-igen Agarose-Gel aufgetrennt gezeigt. Durch Vergleich mit bekannten Größenstandards (siehe Spur a) konnte das A1-Fragment identifiziert werden (siehe Pfeil). Die Isolierung dieses DNA-Fragmentes erfolgte wie in Abschnitt 3.5.3. beschrieben. Allerdings war es nicht möglich, die DNA sauber zu gewinnen. Vielmehr war sie immer mit einem zweiten DNA-Fragment verunreinigt, das durch Spaltung des A-Fragmentes an der DdeI-Schnittstelle in Position 770 (siehe Abb.8) entsteht. Da die beiden DdeI-Schnittstellen (Position 808 und 770) nur 38 Ba-

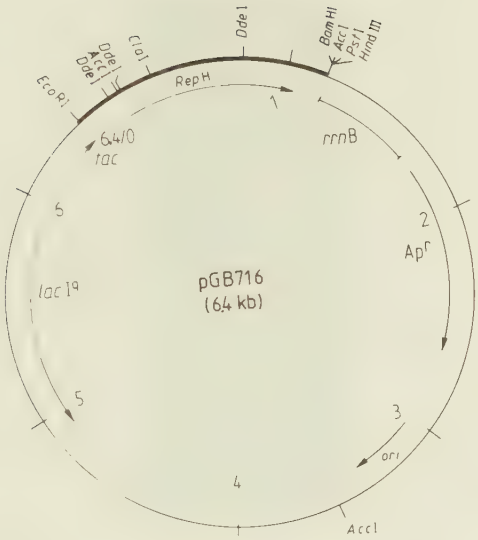

Abb.13: Restriktionskarte des Plasmids pGB716
Aus Abb.12 (Spuren b und c) ergibt sich die hier gezeigte Orientierung A des A-Fragmentes von pC194 (▬) zur Vektor-DNA pJF118(E,H) (-).

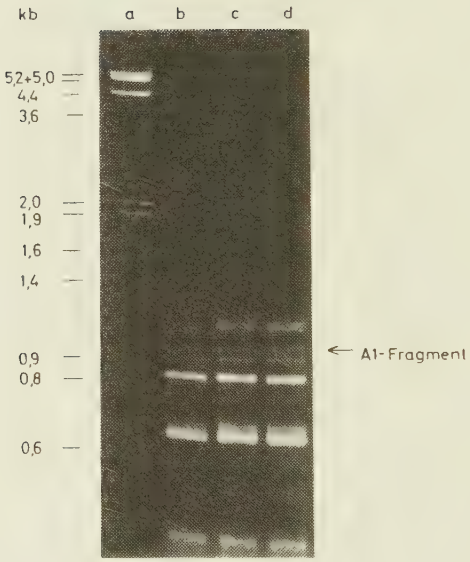

Abb.14: Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten, die bei der partiellen Restriktion des A-Fragmentes mit DdeI entstehen, in einem 2%-igen Agarose-Gel
a)λ-DNA + EcoRI + HindIII
b)A-Fragment + DdeI (5 Minuten Inkubationszeit)
c)A-Fragment + DdeI (10 Minuten Inkubationszeit)
d)A-Fragment + DdeI (15 Minuten Inkubationszeit)
Die Restriktion wurde wie in Abschnitt 3.4.1. beschrieben angesetzt.

senpaare voneinander entfernt liegen, war eine Auftrennung im 2%-igen Agarose-Gel nur teilweise möglich. Im A1-Fragment traten immer Verunreinigungen durch die zweite kleinere DNA auf.

Die Restriktionsendonuklease DdeI erkennt die variable Pentasequenz CTNAG (siehe Tab.2). In Position 770 liegt die Sequenz CTCAG und in Position 808 CTTAG vor. Dieser Unterschied wurde in der folgenden Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase (vgl. Abschnitt 3.4.2.) ausgenutzt. Anstatt alle vier dNTP's in den Reaktionsansatz zu geben, wurde die Reaktion nur mit dATP und dTTP durchgeführt. Dadurch wurde nur das eine DdeI-Ende mit der Schnittsequenz C/TTAG (Position 808) zu glatten Enden aufgefullt (siehe Abb.15, Spur b). Spur a zeigt zum Vergleich noch einmal das 1123 Bp große A-Fragment. Anschließend wurde das A1-Fragment in den mit SmaI geschnittenen und mit alkalischer Phosphatase behandelten Vektor pJF118(E,H) (siehe Abb.15, Spur d, vgl. Abschnitt 4.1.1.) ligiert (vgl. Abschnitt 3.4.7.). Allerdings wurde das Verhältnis von A1-Fragment zu Vektor-DNA auf 20 zu 1 erhöht. Ein Aliquot des Ligationsansatzes wurde in Abb.15, Spur c analysiert. Der E.coli Stamm HB101 wurde mit dem Ligationsansatz transformiert (vgl. Abschnitt 3.4.8.). Die Transformationseffizienz lag mit 10^2 Transformanten pro µg DNA sehr niedrig. Eine Selektion auf Anwesenheit von Plasmid-DNA erfolgte über das Ampicillin-Resistenzgen des Vektors pJF118(E,H). Mehrere hundert Bakterienklone wurden auf die Insertion des A1-Fragmentes in ihre Plasmid-DNA überprüft. Diesem Zweck diente die Schnellisolierung von Plasmiden nach der Methode von Holmes und Quigley (vgl. Abschnitt 3.3.3.). Die isolierten Plasmide wurden mit EcoRI und HindIII geschnitten, um die Insertion wieder herauszuschneiden (vgl. die Anordnung der Schnittstellen von EcoRI, SmaI und HindIII in Abb.7). In Abb.16 wird ein Gel mit den entsprechenden Restriktionsfragmenten gezeigt. Die Mehrzahl der Plasmide besaß lediglich die Größe der Vektor-DNA pJF118(E,H) (siehe Spuren a,c-h). Dagegen lag

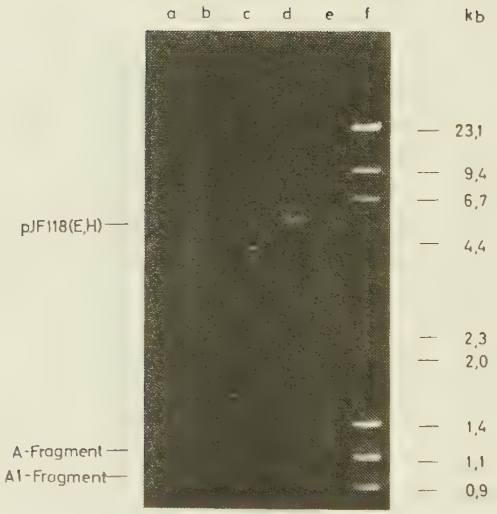

Abb.15: Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten und Ligationsprodukten (pJF118-A1) in einem 1%-igen Agarose-Gel

a)A-Fragment

b)A1-Fragment

c)Ligationsprodukte

d)pJF118(E,H) + SmaI + Alkalische Phosphatase

e)pJF118(E,H)

f)λ-DNA + HindIII,ØX174 RF-DNA + HaeIII

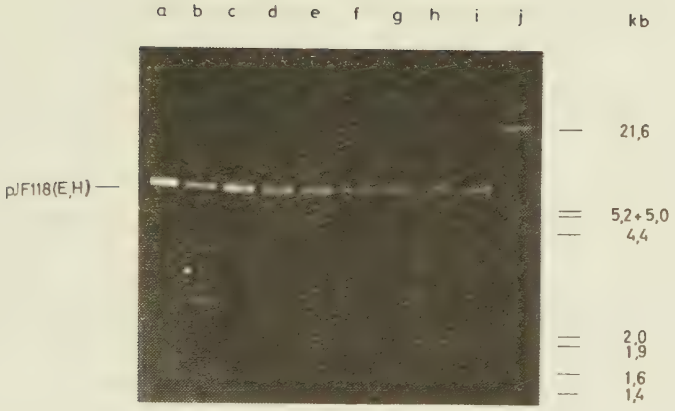

Abb.16: Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA (pJF118-A1) mit EcoRI und HindIII in einem 1%-igen Agarose-Gel

a)pGB751 + EcoRI + HindIII
b)pGB752 + EcoRI + HindIII
c)pGB753 + EcoRI + HindIII
d)pGB754 + EcoRI + HindIII
e)pGB755 + EcoRI + HindIII
f)pGB756 + EcoRI + HindIII
g)pGB757 + EcoRI + HindIII
h)pGB758 + EcoRI + HindIII
i)pGB759 + EcoRI + HindIII
j)λ-DNA + EcoRI + HindIII

der Prozentsatz der rekombinanten Plasmide bei nur 0,2% (siehe Spuren b,i). Allerdings lag das A1-Fragment in der Plasmid-DNA pGB759 (siehe Spur i) als Dimer, im Plasmid pGB752 (siehe Spur b) gar als Trimer vor, was auf das hohe Verhältnis von A1-Fragment zu Vektor-DNA bei der Ligationsreaktion zurückgeführt werden kann. Häufig traten dagegen Deletionsderivate auf, deren Prozentsatz zwischen 5 und 10% variierte (Daten nicht gezeigt). Nur zwei von 18 rekombinanten Plasmiden enthielten das gewünschte A1-Fragment. Deren DNA wurde einer weitergehenden Restriktionsanalyse unterzogen, deren Ergebnis schematisch in Abb.17 zusammengefaßt wurde. Beide Plasmide (pGB809, pGB881) wiesen die dort gezeigte Orientierung A von A1-Fragment zur Vektor-DNA auf. Die restlichen Plasmide enthielten entweder Multimere oder aber das kleinere DNA-Fragment, das als Verunreinigung des A1-Fragmentes auftrat. Letztere Plasmide besaßen nicht die AccI-Schnittstelle, die in Position 774 genau zwischen den beiden kritischen DdeI-Schnittstellen in Position 770 und 808 liegt (siehe Abb.[8], Tab.3).

4.2.3. Expression des RepH-Gens

Die E.coli-Kulturen mit den rekombinanten Plasmiden wurden auf eine Überproduktion des Genprodukts A getestet. Dazu wurde der tac-Promotor des Plasmids durch IPTG induziert (vgl. Abschnitt 3.4.10.). Nach 6 Stunden wurden die Zellen aufgeschlossen, und das Proteingemisch wurde auf einem 15%-igen Polyacrylamid-Gel (vgl. Abschnitt 3.5.2.) elektrophoretisch aufgetrennt. In Abb.18 ist nach IPTG-Induktion deutlich die starke Anreicherung eines Proteins in den Zellen mit dem rekombinanten Plasmid pGB809 zu erkennen (vgl. Spur a mit Spur b). Dagegen kann in Zellextrakten, die das Plasmid pGB881 (Daten nicht gezeigt) oder das Vektorplasmid pJF118(E,H) (siehe Spuren c,d) enthalten, keine derartige Proteinüberproduktion nachgewiesen werden; ebensowenig in plasmidfreien Extrakten (siehe Spuren e,f) oder solchen die das Plasmid pGB712 bzw. pGB716 (siehe

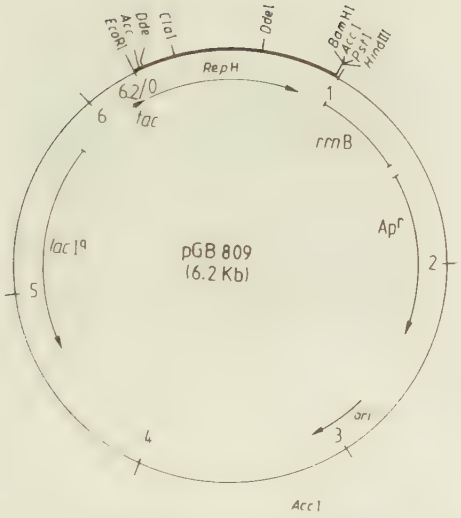

Abb17: Restriktionskarte des Plasmids pGB809
Das Plasmid pGB809 besteht aus dem Vektor pJF118(E,H) (-) und dem A1-Fragment von pC194 (▬).

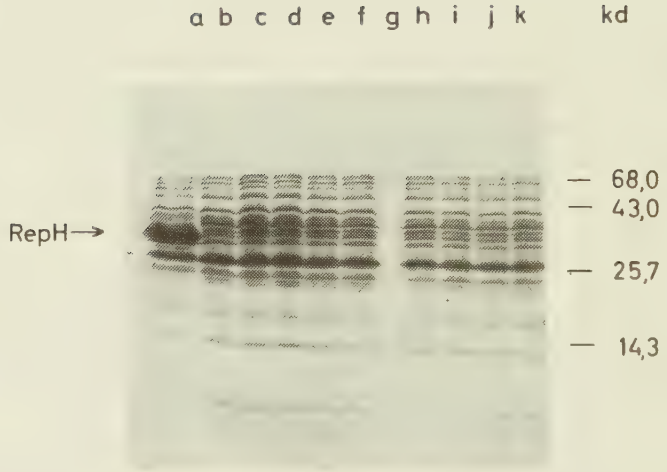

Abb.18: Elektrophoretische Auftrennung von Zellrohextrakten in einem 15%-igen Polyacrylamid-Gel

a)HB101(pGB809) + IPTG
b)HB101(pGB809)
c)HB101(pJF118-E,H) + IPTG
d)HB101(pJF118-E,H)
e)HB101 + IPTG
f)HB101
g)Referenzproteine:

Rinderserumalbumin	68000 d
Ovalbumin	43000 d
Chymotrypsinogen A	25700 d
Lysozym	14300 d

h)HB101(pGB712) + IPTG
i)HB101(pGB712)
j)HB101(pGB716) + IPTG
k)HB101(pGB716)

Abb.11) enthalten, die beide durch Klonierung des A-Fragmentes in den Vektor pJF118(E,H) entstanden sind (siehe Spuren h-k). Durch Vergleich mit bekannten Proteinstandards konnte die Proteingröße mit 33.000 d ermittelt werden. Aus der DNA-Sequenz läßt sich für den offenen Leseraster A (angefangen beim ersten ATG Codon - Position 803 - bis zum letzten Aminosäuretriplett - Position 2855) die theoretische Größe des Genprodukts A mit 34.152 d errechnen (siehe Abb.8). Das Protein wurde gemäß Iordanescu und Surdeanu (1981) RepH genannt, seine Funktion in der Plasmidreplikation konnte in den Abschnitten 4.3. und 4.5. nachgewiesen werden. In Abb.19 wird eine Zeitkinetik der Proteinsynthese des Stammes HB101(pGB809) nach erfolgter IPTG-Induktion gezeigt. Eine deutliche Proteinbande erscheint erst nach 15 Minuten (siehe Spur e). Danach steigt die Intensität der Bande stetig an (siehe Spuren f-i) und erreicht nach 120 Minuten ein Maximum (siehe Spur i). Die Größe des Proteins wurde aus diesem Polyacrylamid-Gel durch Vergleich mit bekannten Proteinen (siehe Spur a) mit 31.000 d extrapoliert.

4.3. In vivo Komplementation einer RepH-Deletion

4.3.1. Strategie

Um nachzuweisen, daß das in Abschnitt 4.2. klonierte A1-Fragment ein funktionsfähiges RepH-Protein exprimiert, wurde ein *in vivo* Replikationssystem in *B.subtilis* aufgebaut, in dem das RepH-Protein des Plasmids pGB809 *in trans* eine RepH-Mutante komplementiert. Als RepH-Mutante (Satellit) wurde eine Deletionsmutante des Plasmids pHV14 (siehe Abb.9) verwendet. Das Hybridplasmid besitzt Resistenzgene gegen Ampicillin und gegen Chloramphenicol. Es wurde durch Kopplung des *E.coli* Plasmids pBR322 mit dem *B.subtilis* Plasmid pC194 über ihre *Hin*dIII-Erkennungssequenz konstruiert (Ehrlich 1978). Die vollständige DNA-Sequenz ist bekannt (Sutcliffe 1977, Horinouchi und Weisblum 1982). Die Konstruktion der Deletionsmutante erfolgte in

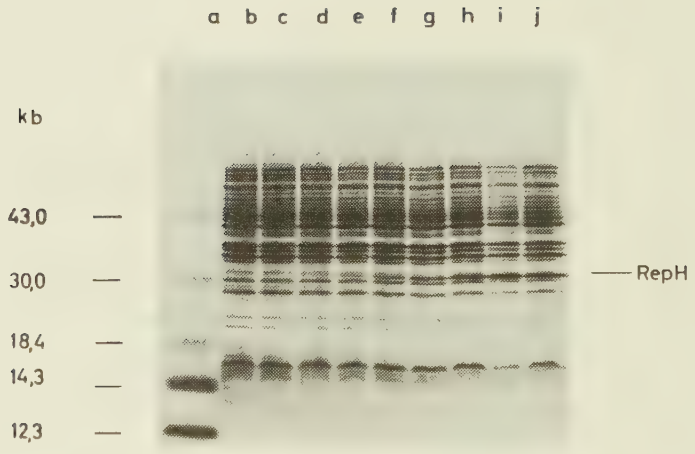

Abb.19: Elektrophoretische Auftrennung von IPTG-induzierten Zellextrakten des E.coli-Stammes HB101(pGB809) in einem 15%-igen Polyacrylamid-Gel

a) Referenzproteine:
Ovalbumin 43.000 d; Carboanhydrase 30.000 d
ß-Lactoglobulin 18.400 d; Lysozym 14.300 d
Cytochrom C 12.300 d

Induktionszeit nach IPTG Zugabe:

b) 0 Min. c) 5 Min. d) 10 Min.
e) 15 Min. f) 20 Min. g) 15 Min.
h) 60 Min. i) 120 Min. j) 240 Min.

E.coli, da das Plasmid mit der Deletion im RepH-Gen nicht mehr in B.subtilis replikationsfähig war (vgl. Tab.5). Als Helferplasmid wurde das Plasmid pGB809 (siehe Abb.17) verwendet, in dem das RepH-Gen hinter den tac-Promotor des Plasmids pJF118(E,H) kloniert worden war (vgl. Abschnitt 4.1.). Als pBR322-Derivat kann pGB809 aber nicht in grampositiven Bakterien replizieren. Außerdem wird die Ampicillin-Resistenz, die aus dem Transposon Tn9 stammt (Alton und Vapnek 1979), nicht in B.subtilis exprimiert, da sowohl die RNA-Polymerase als auch das B.subtilis Ribosom die entsprechenden regulatorischen Sequenzen von E.coli in der Regel nicht erkennen (Stallcup 1974, Shorenstein und Losick 1975, Ehrlich 1978). Um eine Replikation in B.subtilis zu ermöglichen und um eine Antibiotika-Resistenz als Selektionsmarker einzuführen, wurde deshalb das Plasmid pGB809 mit dem B.subtilis Plasmid pUB110 rekombiniert. Das Plasmid pUB110 (siehe Abb.22) stammt aus S.aureus (Lacey und Chopra 1974), wird in B.subtilis repliziert (Gryczan et al. 1978), besitzt ein Kanamycin-Resistenzgen und ist 4,5 kb groß (Jalanko 1981). Die Bestimmung des Replikationsstartpunkts geht auf die Arbeit von Scheer-Abramowitz (1981) zurück. Das Plasmid pUB110 enthält eine einzige BamHI-Schnittstelle.
Die Funktionalität des RepH-Proteins wurde durch Transformation von kompetenten B.subtilis Zellen mit der RepH-Mutante alleine und in Gegenwart des Helferplasmids nachgewiesen.

4.3.2. Konstruktion der RepH-Mutante pHV14ΔNsiI

Aus der DNA-Sequenz des Plasmids pHV14 (siehe Tab.3,4) ergibt sich, daß die Restriktionsendonuklease NsiI zweimal im Leseraster A des Plasmids pC194 schneidet (Positionen 109 und 568). Dagegen besitzt das Enzym keine weitere Erkennungssequenz auf der restlichen pC194-DNA und auch nicht auf der pBR322-DNA (siehe Tab.4). Daher war es leicht möglich, in vitro eine Deletionsmutante im RepH-Gen des Plasmids pHV14 zu konstruieren:
Das Plasmid pHV14 wurde mit dem Restriktionsenzym NsiI ge-

schnitten. Die beiden entstandenen DNA-Fragmente (A = 6808 Bp, B = 459 Bp) wurden auf einem 1%-igen Agarose-Gel aufgetrennt (siehe Abb.20, Spur d). Das größere DNA-Fragment wurde aus dem Gel zurückgewonnen (siehe Spur c) und anschließend mit T4 DNA-Ligase zirkularisiert (siehe Spur b). Dazu wurden die Bedingungen gemäß Abschnitt 3.4.7. gewählt mit dem Unterschied, daß die DNA-Konzentration auf 10% reduziert wurde, denn die Zirkularisation einer DNA verläuft statistisch gesehen bedeutend effektiver als die Ligation zweier DNA-Fragment (Maniatis 1982, S.288 ff). Zwei zusätzliche, diskrete Banden höhermolekularer DNA traten auf (siehe Abb 20, Spur b). Als Kontrolle wurde in Spur f die ungeschnittene pHV14-DNA aufgetragen, die als getwistete cc-Form vorliegt. Die mit EcoRI linearisierte DNA bildet eine DNA-Bande von 7272 Bp (siehe Spur e). Mit dem Ligationsansatz wurde der E.coli Stamm HB101 transformiert, wobei auf Ampicillin-Resistenz (pBR322) und auf Chloramphenicol-Resistenz (pC194) selektioniert wurde. Die Transformationsrate lag bei 10^4 Transformanten/µg DNA. Von acht Bakterienklonen wurde DNA isoliert, die einer Restriktionsanalyse mit dem Enzym HindIII unterworfen wurde. Durch diese Restriktion wird das Plasmid pHV14 in die beiden Plasmide pBR322 und pC194 gespalten (siehe Abb.21, Spur e). Die Mutanten wiesen gleichfalls die pBR322-Bande auf, besaßen aber eine Deletion im pC194-Anteil (vgl. pC194-Bande in Spur e mit Bande A in den Spuren a-d). Die Deletion konnte an Hand der Größenstandards (siehe Spur f) zu 500 ± 50 Bp bestimmt werden. Die theoretische Größe der Deletion (siehe Tab.3) liegt bei 459 Bp. DNA der Plasmide pHV14ΔNsiI-1 und pHV14ΔNsiI-2 wurde über CsCl-Gradientenzentrifugation gereinigt (vgl. Abschnitt 3.2.1.) und bei den Transformationsversuchen im Abschnitt 4.3.4. eingesetzt.

4.3.3. Konstruktion des Hybridplasmids pGB809-pUB110

Die beiden Plasmide pGB809 (siehe Abb.17) und pUB110 (siehe Abb.22 besitzen jeweils eine einzige Erkennungsstelle

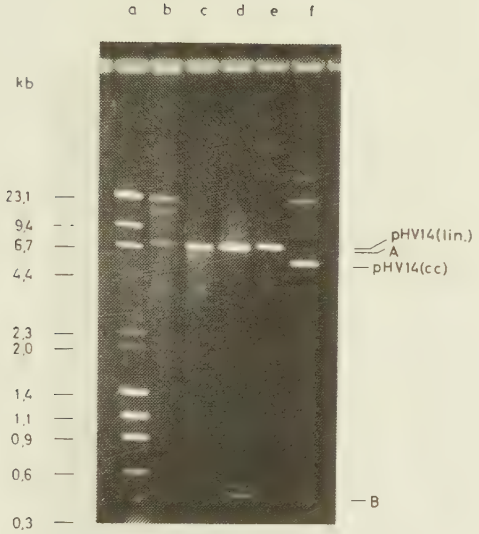

Abb.20: Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten und Zirkularisationsprodukten (pHV14ΔNsiI) in einem 1%-igen Agarose-Gel

a)λ-DNA + HindIII,ØX174 + HaeIII

b)pHV14ΔNsiI + T4 DNA-Ligase

c)pHV14ΔNsiI (6808 Bp)

d)pHV14 + NsiI (A = 6808 Bp, B = 459 Bp)

e)pHV14 + EcoRI (lineare Form/7267 Bp)

f)pHV14 (cc-Form)

Die in Klammern angegebene Größe der Restriktionsfragmente wurde aus den publizierten DNA-Sequenzen des Plasmids pC194 (Horincuchi 1982) und pBR322 (Sutcliffe 1979) berechnet.

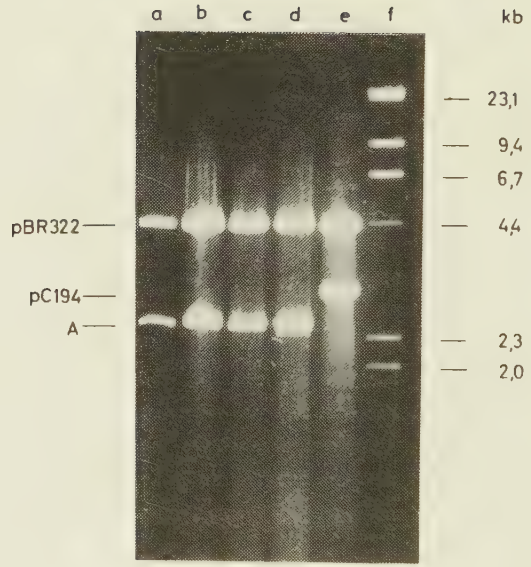

Abb.21: Restriktionsanalyse von rekombinanter Plasmid-DNA (pHV14ΔNsiI) mit HindIII im 1%-igen Agarose-Gel

a)pHV14ΔNsiI-1 + HindIII (pBR322 = 4366 Bp, A = 2447 Bp)
b)pHV14ΔNsiI-2 + HindIII (pBR322 = 4366 Bp, A = 2447 Bp)
c)pHV14ΔNsiI-3 + HindIII (pBR322 = 4366 Bp, A = 2447 Bp)
d)pHV14ΔNsiI-4 + HindIII (pBR322 = 4366 Bp, A = 2447 Bp)
e)pHV14 + HindIII (pBR322 = 4366 Bp, pC194-DNA = 2906 Bp)
f)λ-DNA + HindIII

Die Größe der Restriktionsfragmente wurde aus den Angaben von Horinouchi und Weisblum (1982) und Sutcliffe et al. (1979) berechnet.

Abb.22: Restriktionskarte des Plasmids pUB110
Die Lage der Schnittstellen geht auf die Daten von Gryczan (1978) und Jalanko (1981) zurück. Die Karte zeigt außerdem das Gen für die Kanamycin-Resistenz (Km^r), sowie den Startpunkt (ori) der DNA-Replikation (Scheer-Abramowitz 1981).

für die Endonuklease BamHI. Diese Schnittstellen wurden für die Rekombination benutzt:
Die Plasmide pGB809 und pUB110 wurden mit dem Enzym BamHI linearisiert. Von beiden Restriktionsansätzen wurden Aliquots miteinander ligiert. Mit dem Ligationsgemisch, das fast vollständig aus rekombinanter DNA bestand, wurde der E.coli Stamm DH1 transformiert, selektioniert wurde dabei auf die Expression der Antibiotika-Resistenz der Bakterien gegen Ampicillin (pGB809) und Kanamycin (pUB110). Die Transformationseffizienz lag bei 10^3 Transformanten pro µg DNA. Von acht Bakterienklonen wurde nach der Methode von Holmes und Quigley Plasmid-DNA isoliert, die mit BamHI restringiert wurde, so daß die rekombinante DNA wieder in die beiden Ausgangsplasmide pGB809 und pUB110 gespalten wurde (siehe Abb.23, Spuren b,c). Alle untersuchten Bakterienklone besaßen die gewünschte rekombinante Plasmid-DNA (siehe als Beispiel Spur a). Mit der DNA pGB8091 wurden anschließend die B.subtilis Stämme BD170 und BR151 transformiert (vgl. Abschnitt 3.4.9.). Dabei erfolgte die Selektion nur auf die Expression der Kanamycin-Resistenz, die vom Plasmid pUB110 stammt, da das Ampicillin-Resistenzgen des Plasmids pGB809 in B.subtilis nicht exprimiert wird. Wiederum wurden acht Bakterienklone näher charakterisiert. Dazu wurde DNA nach der Methode von Birnboim (vgl. Abschnitt 3.3.4.) isoliert und ebenfalls wie schon für E.coli beschrieben mit BamHI gespalten. Alle Plasmide wiesen das erwartete Restriktionsmuster auf (siehe Abb.23, Spuren e-i).

4.3.4. In vivo Komplementation des Satelliten pHV14ΔNsiI durch das Helferplasmid pGB8091

Das Satellitenplasmid pHV14ΔNsiI-1, das eine RepH-Mutante des Plasmids pHV14 darstellt (vgl. Abschnitt 4.3.2 und Abb.21), war in B.subtilis nicht replikationsfähig. Ziel dieses Versuches war es, die defekte RepH-Funktion durch das RepH-Protein in trans zu komplementieren. Die Trans-

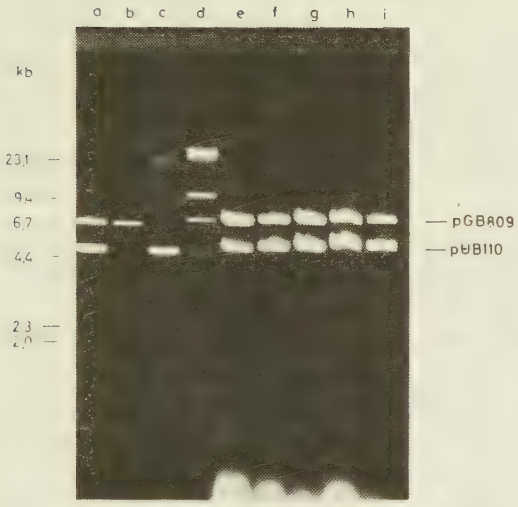

Abb.23: Restriktionsanalyse der Hybridplasmide pGB8091-8096 (pUB110-pGB809) mit BamHI in einem 1%-igen Agarose-Gel

a)pGB8091 + BamHI (6,2 kb, 4,5 kb) aus E.coli isoliert
b)pGB809 + BamHI (6,2 kb)
c)pUB110 + BamHI (4,5 kb)
d)λ-DNA + HindIII
e)-i)pGB8092 - pGB8096 + BamHI (6,2 kb, 4,5 kb) aus B.subtilis isoliert

Die Größe der Plasmid-DNA ergibt sich aus den Abbildungen 17 und 22.

formation der B.subtilis Sphäroplasten erfolgte gemäß Abschnitt 3.4.9., und wurde als Doppelansatz durchgeführt. Verwendung fanden die beiden Stämme BD170 und BR151. Für die Transformationen wurde Plasmid-DNA aus E.coli benutzt, die über CsCl-Gradienten gereinigt worden war. Selektioniert wurde im Fall der Plasmide pHV14ΔNsiI-1, pHV14ΔNsiI-2 und pUB110 auf die Expression ihrer Kanamycin-Resistenzgene, im Fall der Plasmide pGB8091 und pGB8092 auf ihre Chloramphenicol-Resistenz. Die gemittelten Ergebnisse wurden in Tabelle 5 zusammengefaßt

Tab.5: Transformation verschiedener B.subtilis-Stämme mit den Plasmiden pHV14ΔNsiI und pGB8091

B.subtilis-Stamm	Transformationsrate Transformanten/µg DNA			
	pGB8091 (RepH$^+$)	pGB8092 (RepH$^+$)	pHV14ΔNsiI-1 (RepH-Mutante von pHV14)	pHV14ΔNsiI-2 (RepH-Mutante von pHV14)
BD170	$3X10^5$	$4X10^5$	<1	<1
BD170(pGB8091)	-	-	$6X10^3$	$4X10^3$
BD170(pGB8092)	-	-	$3X10^3$	$5X10^3$
BD170(pUB110)	-	-	<1	<1
BR151	$4X10^5$	$7X10^5$	<1	<1
BR151(pGB8091)	-	-	$7X10^3$	$8X10^3$
BR151(pGB8092)	-	-	$4X10^3$	$8X10^3$
BR151(pUB110)	-	-	<1	<1

Die beiden verwendeten B.subtilis Stämme verhielten sich identisch. Beide Stämme wurden durch die Plasmide pGB8091 und pGB8092 transformiert, da hier das pUB110-Replikon die Replikationsfunktionen zur Verfügung stellte. Anders bei den Plasmiden pHV14ΔNsiI-1 und pHV14ΔNsiI-2, die wegen ihres Defekts im RepH-Gen nicht in B.subtilis replizieren können. Beide Plasmide können aber die Bakterienstämme BD170(pGB8091), BD170(pGB8092), BR151(pGB8091) und BR151(pGB8092) transformieren. Das bedeutet, daß in diesen Stämmen das RepH-Protein vom Helferplasmid exprimiert wird

und dem hereinkommenden Satellitenplasmid in trans zur Replikation zur Verfügung stellen kann. Ein Vergleich mit den Stämmen BD170(pUB110) und BR151(pUB110) zeigt, daß eine entsprechende Komplementation mit dem Plasmid pUB110 nicht möglich ist.
Zur Kontrolle wurde von jedem Transformationsansatz aus acht Bakterienklonen Plasmid-DNA analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß tatsächlich die jeweils erwarteten Plasmide in den Bakterienzellen vorlagen, und daß keine Rekombination oder Deletion stattgefunden hatte (Daten nicht gezeigt).

4.4. Entwicklung eines pC194 Replikationssystem

Eines der Ziele dieser Arbeit bestand im Aufbau eines B.subtilis in vitro Replikationssystems. Als Replikationsmodell wurde das S.aureus/B.subtilis Plasmid pC194 ausgesucht, da dieses kleine, sehr gut charakterisierte Plasmid (Ehrlich 1977, Horinouchi und Weisblum 1982) eine bedeutende Rolle als Klonierungsvektor für B.subtilis spielt (Ehrlich 1978, Lovett und Keggins 1979).

4.4.1. Replikation des Plasmids ColE1 in zellfreien Extrakten von E.coli

Als Vergleichssystem und zur Kontrolle der optimalen Reaktionsbedingungen dienten die ermittelten Replikationseigenschaften des Plasmids ColE1 in einem zellfreien Rohextrakt des E.coli Stammes C600 (vgl. Abschnitt 3.6.1.).
ColE1 ist ein 6,5 kb großes E.coli Plasmid, das mit etwa 15 Kopien in der Zelle vorliegt und für Colicin E1 kodiert (Staudenbauer 1978b). In diesem Test, in dem gleichzeitig der Einfluß einer Reihe von Inhibitoren der DNA-Replikation auf die ColE1-Synthese studiert wurde, ergaben sich die folgenden Ergebnisse (siehe Tab.6):

Tab.6: Replikation des Plasmids ColE1 im zellfreien E.coli-Extrakt

Reaktionskomponenten Inhibitoren	Konzentration	DNA-Synthese (%)
komplettes System	-	100
+ araCTP	0,5 mM	2
+ CMS	0,2 mM	14
+ Coumermycin	50 µg/ml	24
+ Kanamycin	100 mM	107
+ Nalidixinsäure	50 µg/ml	7
+ N-Ethylmaleimid	2 mM	15
+ Novobiocin	10 µg/ml	3
+ Oxolinsäure	50 µg/ml	7
+ Phosphonoessigsäure	0,2 mg/ml	16
+ Phosphonoacetat	0,2 mg/ml	139
+ Rifampicin	50 µg/ml	6
+ Streptolydigin	500 µg/ml	27
+ Streptomycin	100 mM	106
- ATP,GTP,CTP,UTP	-	4
- GTP,CTP,UTP	-	4
- ATP	-	3

Der verwendete zellfreie Extrakt E.coli C600 ergab im Standardreplikationsansatz mit der Plasmid-DNA einen Einbau von 160 pMol dTMP (=100%). Der Extrakt wurde mit den jeweils angegebenen Inhibitoren 5 Minuten präinkubiert bevor die restlichen Reaktionskomponenten zugegeben wurden.Die Kontrolle ohne DNA ergab einen Nullwert von 4 pMol dTMP-Einbau.

Die ColE1-Replikation ist stark rNTP-abhängig; das bedeutet, daß bei der Initiation der Plasmid-Replikation eine Primer-RNA synthetisiert wird (Staudenbauer 1978). Diese Funktion wird von der E.coli RNA-Polymerase wahrgenommen, die sowohl durch Rifampicin (Murray und Rabinowitz 1981) als auch durch Streptolydigin (Cassani 1971) vollständig

inhibiert wird. Deshalb bewirken diese beiden Hemmstoffe auch eine drastische Reduktion der ColE1-Synthese. Derselbe Effekt wird durch Einsetzen von Inhibitoren der DNA-Gyrase erzielt. So hemmen die Antibiotika Nalidixinsäure und Oxolinsäure die α-Untereinheit der DNA-Gyrase (Orr und Staudenbauer 1982), Novobiocin und Oxolinsäure dagegen indirekt über ihre Bindung an die DNA die ß-Untereinheit (Shen und Perret 1985). Aus der Hemmung der ColE1-Replikation durch diese Substanzen läßt sich auf eine wesentliche Beteiligung der DNA-Gyrase schließen; ein starkes Indiz für eine semikonservative Replikation (Staudenbauer 1975,1978). Zusätzlich benötigt das Plasmid auch die DNA-Polymerase I zu seiner Verdopplung, denn die Plasmidsynthese wird durch Phosphonoessigsäure (PAA), einem Inhibitor der Polymerase I (Cozzarelli 1977), unterbrochen, nicht aber durch die Kontrollsubstanz Phosphonoacetat (PPA). Auch die DNA-Polymerase besitzt eine wichtige Funktion in diesem Replikationssystem, denn der als Analogon zu dCTP wirkende Inhibitor der DNA-Polymerasen II und III - araCTP - (Rashbaum und Cozzarelli 1976) hemmt die ColE1-Synthese komplett. Dagegen tritt keine Inhibierung der Replikation durch Unterbrechung der Proteinbiosynthese mit Hilfe der beiden Antibiotika Kanamycin und Streptomycin (Nierhaus und Wittmann 1980) auf. Gehemmt wird die ColE1-Replikation allerdings durch CMS und NEM - beide Substanzen blockieren SH-Gruppen.

4.4.2. Endogene DNA-Replikation des Plasmids pC194 in zellfreien Extrakten von B.subtilis

Nachdem die Reaktionsbedingungen für das ColE1-System in zellfreien Extrakten von E.coli optimiert worden war, wurde die Replikation des Plasmids pC194 im zellfreien B.subtilis Rohextrakt untersucht. Dazu wurde es notwendig, die für E.coli übliche Extraktpräparation (Staudenbauer et al. 1978, Diaz et al. 1981) zu variieren (vgl. Abschnitt 3.6.2.).

Zunächst wurde ein B.subtilis Rohextrakt des Stammes BD170 mit verschiedenen endogen zugesetzten Plasmiden auf seine Replikationskapazität getestet. Es zeigte sich aber bei keiner DNA ein signifikanter Einbau von dTMP in die Plasmid-DNA. Analysiert wurde das Replikationsverhalten der B.subtilis Plasmide pC194, pC194-1 und pUB110, sowie der E.coli Plasmide ColE1, pBR322, pSC101 und M13 RF (Daten nicht gezeigt). Erst bei Verwendung eines B.subtilis Rohextraktes, der schon endogen das Plasmid pC194 bzw. die Kopienzahl-Mutante pC194-1 (Alonso und Trautner 1985a) enthielt, konnte DNA-Replikation nachgewiesen werden. Trotz identischer Anzuchtbedingungen der Bakterienkulturen und trotz normierter Extraktpräparation variierten die B.subtilis Extrakte häufig in ihrer Fähigkeit, das Plasmid pC194 zu replizieren. Die Ergebnisse resultieren daher aus den Mittelwerten von fünf verschiedenen B.subtilis Extrakten mit vergleichbaren Einbauraten. Die Versuche wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt; soweit angegeben wurde 1 µg pC194-DNA exogen zugegeben. Verschiedene Extrakte wurden ausgetestet; neben Rohextrakten auch Ammoniumsulfat-Fraktionen, die gemäß der in Abschnitt 3.6.1. für E.coli beschriebenen Methode hergestellt wurden. Der Test auf DNA-Replikation wurde in Abschnitt 3.6.3. beschrieben. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tab.7: Replikation des Plasmids pC194 in zellfreien B.subtilis-Extrakten

Extrakt	DNA	Einbau dTMP (pMol)
BD170		4
BD170	+ pC194-DNA	6
BD170 (pC194)		21
BD170 (pC194-1)		35
BD170 (pC194-1)	+ pC194-DNA	44
BD170 (pC194-1) AS43	+ pC194-DNA	8
BD170 (pC194-1) AS70	+ pC194-DNA	7

Im zellfreien Rohextrakt BD170 konnte keine DNA-Synthese nachgewiesen werden, wohl aber in zellfreien Extrakten, die endogen das Plasmid pC194 oder dessen Kopienzahl-Mutante pC194-1 enthielten. Dieses Resultat deutet auf die Beteiligung einer plasmidkodierten Replikationsfunktion hin. Eine weitere, leichte Steigerung der Replikationsrate konnte durch Zugabe von exogener pC194-DNA zu diesen Rohextrakten erzielt werden. Dagegen waren die Ammoniumsulfatfraktionen allesamt inaktiv.

Die endogene DNA-Synthese des Plasmids pC194 in zellfreien B.subtilis Extrakten wurde durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren der DNA-Replikation näher charakterisiert. Auf diese Weise sollte eine mögliche Beteiligung verschiedener wirtskodierter Replikationsproteine überprüft werden. Dazu wurde der Rohextrakt BD170(pC194-1) mit den jeweiligen Inhibitoren fünf Minuten auf Eis präinkubiert bevor der Replikationsansatz durch Zugabe der übrigen Reaktionskomponenten gestartet wurde. Die Konzentration der Inhibitoren entsprach den in Tab.6 genannten Werten. 100% DNA-Synthese entsprachen einem Einbau von 31 pMol dTMP. Die Resultate wurden als Mittelwerte von Doppelbestimmungen aus drei verschiedenen Extrakten berechnet und in Tabelle 8 aufgelistet.

Tab.8: Reaktionsbedingungen für die Replikation der endogenen Plasmid-DNA pC194-1 im zellfreien B.subtilis Rohextrakt (BD170)

Reaktionskomponenten Inhibitoren	DNA-Synthese (%)
komplettes System	100
+ araCTP	44
+ Chloromercurophenylsulfonylsäure	7
+ Coumermycin	83
+ HPUra (1 mM)	38
+ Kanamycin	96
+ Nalidixinsäure	67
+ N-Ethylmaleimid	10
+ Novobiocin	82
+ Oxolinsäure	69
+ Phosphonoessigsäure	67
+ Phosphonoacetat	78
+ Rifampicin	85
+ Streptolydigin	123
+ Streptomycin	96
+ Endonuklease (4E)	5
- ATP,GTP,CTP,UTP	5
- GTP,CTP,UTP	20
- ATP	5

Aus Tabelle 8 geht hervor, daß für die pC194-Replikation alle vier Ribonukleosid-Triphosphate erforderlich sind. Dieses Resultat deutet auf die Bildung eines RNA-Primers bei der Initiation der Plasmid-Replikation hin. Der Primer wird im Gegensatz zum ColE1-System durch ein Rifampicin- und Streptolydigin-resistentes Enzym synthetisiert. Diese Funktion könnte z.B. von einem plasmidkodierten Replikationsprotein wahrgenommen werden, aber auch eine resistente B.subtilis Primase wäre denkbar.

Die DNA-Elongation erfolgt überwiegend über die DNA-Polymerase III von B.subtilis, da eine Hemmung der Plasmidreplikation - allerdings unvollständig - durch araCTP und HPUra auftritt. AraCTP ist ein Inhibitor der DNA-Polymerasen II und III von E.coli und B.subtilis (Rashbaum und Cozzarelli 1976), HPUra dagegen ist ein spezifischer Hemmstoff der DNA-Polymerase III von B.subtilis (Brown 1971, Gass et al. 1973a,b). Da in Gegenwart von HPUra eine Restsynthese von 38% auftritt kann eine Beteiligung der anderen DNA-Polymerasen an der pC194-Replikation nicht ausgeschlossen werden. Andererseits zeigt der Versuch mit Phosphonoessigsäure (PAA), einem Inhibitor der DNA-Polymerase I von E.coli und B.subtilis (Cozzarelli 1977), daß dieses Replikationsenzym ganz im Gegensatz zur ColE1-Replikation in E.coli nur eine untergeordnete Rolle spielt. Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung der DNA-Polymerase III von B.subtilis an der Verdopplung des Plasmids pC194 ergibt sich aus der vollständigen Inhibierung der DNA-Synthese durch CMS und NEM. Nach Gass und Cozzarelli (1979) wird bei den hier gewählten Konzentrationen vor allem die DNA-Polymerase III gehemmt, während die Polymerasen I und II resistenter sind (Gass et al. 1973a,b). Allerdings kann eine zusätzliche Hemmung von anderen Replikationsproteinen nicht ausgeschlossen werden.

Keinen Einfluß auf die Replikation des Plasmids pC194 besitzen die beiden Hemmstoffe der Proteinbiosynthese - Kanamycin und Streptomycin. Durch Inhibierung der DNA-Gyrase wird eine partielle Reduktion der DNA-Synthese auf 70 bis

80% bewirkt. Dabei scheinen die beiden Hemmstoffe der α-Untereinheit der Gyrase - Nalidixinsäure und Oxolinsäure - etwas effektiver zu wirken (70% Restsynthese) als Novobiocin und Coumermycin, welche die ß-Untereinheit inhibieren (Orr und Staudenbauer 1982).
Eine drastische Reduktion der Plasmid-Replikation bis auf 5% wird durch Relaxierung der pC194-DNA durch Einsetzen der Endonuklease von Neurospora crassa erzielt.

Die neusynthetisierten Replikationprodukte dieses in vitro Systems wurden in einem 1%-igen Agarose-Gel aufgetrennt (vgl. Abschnitt 3.5.1.). Abbildung 24 zeigt ein derartiges Gel. Die Replikation der endogenen pC194-1 DNA führt zu neusynthetisierter, superhelikaler DNA (siehe Spuren d,h). In Gegenwart von Novobiocin wurde die DNA in die offen zirkuläre Form überführt, aber auch einige stark relaxierte Zwischenprodukte wurden radioaktiv markiert (siehe Spuren c,g). Die Verwendung von Endonuklease von Neurospora crassa führte zur vollständigen Relaxierung der Plasmid-DNA (siehe Spur f) und zur totalen Hemmung der DNA-Synthese (siehe Spur b). Dagegen führte die Zugabe von Rifampicin, einem Inhibitor der RNA-Polymerase, zu keiner nennenswerten Reduktion der pC194-Replikation (vgl. auch Tab.8).
Es stellte sich die Frage, ob die beobachtete DNA-Synthese nicht nur die Elongation von schon initiierter pC194-DNA darstellt, oder ob auch die Neuinitiation von Plasmid-DNA stattfindet. Zur Klärung dieser Frage wurde ein Miniplasmid von pC194 verwendet. Dieses Miniplasmid entstand durch eine Spontandeletion von etwa 300 Bp und besitzt somit eine Größe von 2,6 kb (Luczak 1985). Die Deletion kartiert in der Region von Position 2500 bis 2800. Das Miniplasmid wurde exogen in das Replikationssystem eingebracht, und aufgrund des Größenunterschiedes konnte im Agarose-Gel leicht zwischen endogener pC194-Replikation und der Replikation von exogen zugegebener mini-pC194 DNA unterschieden werden. Die Replikationsprodukte, die bei der Replikation der beiden DNAś in zwei verschiedenen B.subtilis Stämmen

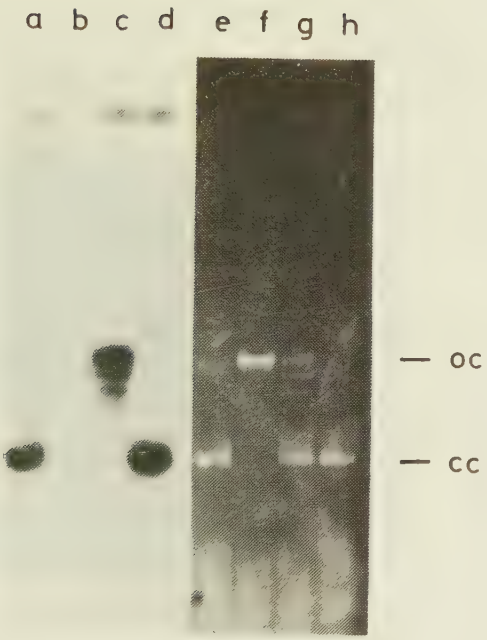

Abb.24: Gelelektrophoretische Auftrennung der im B.subtilis Rohextrakt synthetisierten Replikationsprodukte von endogener pC194-1 DNA in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren

Endogene pC194-1 DNA-Replikation wurde wie in Abschnitt 3.6.4. beschrieben in einem BD170(pC194-1) Extrakt durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Replikationsprodukte in einem 1%-igen Agarose-Gel analysiert. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt (Spuren e-h). Anschließend wurde ein Autoradiogramm angefertigt (Spuren a-d). Folgende Inhibitoren wurden im Replikationsansatz ausgetestet:

a),e) pC194-1
b),f) pC194-1 + Endonuklease aus Neurospora crassa (4E)
c),g) pC194-1 + Novobiocin (50 µg / ml)
d),h) pC194-1 + Rifampicin (50 µg / ml)

entstanden, wurden in einem 1%-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Vor dem Auftrag auf das Gel wurde der gesamte Replikationsansatz mit der Endonuklease AccI linearisiert, so daß die beiden Plasmide jeweils als eine lineare DNA-Bande erschienen und damit besser zu unterscheiden waren (siehe Abb.25). Es konnte eindeutig gezeigt werden, daß neben der pC194-DNA, die endogen in den beiden Extrakten vorlag, auch das exogen zugegebene Miniplasmid repliziert wurde.

4.5. In vitro Komplementation der pC194-Replikation im zellfreien B.subtilis Extrakt durch das RepH-Protein

Aus den in vivo Versuchen in Abschnitt 4.4.2. geht hervor, daß das Genprodukt A (RepH-Protein) des Plasmids pC194 für dessen Replikation benötigt wird. Deshalb wurde aus dem im Abschnitt 4.2. beschriebenen Stamm HB101(pGB809), der nach IPTG-Induktion (vgl. Abschnitt 3.4.10.) eine starke Überproduktion des RepH-Proteins zeigt, ein zellfreier Rohextrakt hergestellt (vgl. Abschnitt 3.6.1) und mit Streptomycinsulfat versetzt, um die endogene pGB809 DNA zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Ammoniumsulfat-Fällung (vgl. Abschnitt 3.6.1.) mit 43%-iger Sättigung (AS43). Der Überstand dieser ersten Ammoniumsulfat-Fällung wurde erneut mit Ammoniumsulfat versetzt (0,16 g AS/ml) und gemäß Abschnitt 3.6.1. weiter aufgearbeitet. Der Extrakt (AS43-70) enthielt Proteine, die bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration zwischen 43% und 70% ausfielen. Mit diesen beiden E.coli Extrakten wurde ein B.subtilis Rohextrakt BD170 komplementiert. Dabei wurde 1 µg pC194 als ´Template´-DNA exogen zugegeben. Die zusammengefaßten Ergebnisse zeigt Tab.9:

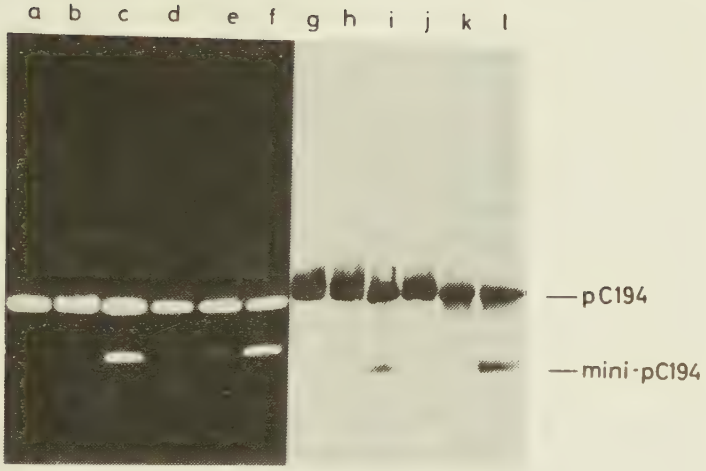

Abb.25: Gelelektrophoretische Auftrennung der im B.subtilis Rohextrakt synthetisierten Replikationsprodukte der endogenen pC194-1 bzw. exogenen mini-pC194 DNA

Replikation von endogener pC194-1 DNA wurde wie im Abschnitt 3.6.4. beschrieben in einem zellfreien Rohextrakt BD170(pC194-1) (siehe Spuren a-c,g-i) bzw. BR151(pC194-1) (siehe Spuren d-f,j-l) durchgefürt. Mini-pC194 DNA wurde exogen zugegeben. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Replikationsprodukte phenolisiert, mit der Restriktionsendonuklease ClaI linearisiert und im 1%-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Nach der Färbung mit Ethidiumbromid (Spuren a-f) wude von dem Gel ein Autoradiogramm angefertigt (Spuren g-l). Folgende DNA wurde im Replikationsansatz analysiert:

a),g),d),j) pC194
b),h),e),k) pC194 + 0,1 µg mini-pC194
c),i),f),l) pC194 + 1,0 µg mini-pC194

Tab.9: Komplementation eines zellfreien Rohextraktes des *B.subtilis* Stammes BD170 mit AS-Fraktionen des *E.coli* Stammes HB101(pGB809)

Extrakt	DNA	DNA-Synthese (pMol dTMP)
BD170	+ pC194	6
BD170 + HB101 (pGB809) AS43	+ pC194	46
BD170 + HB101 (pGB809) AS43	+ pC194-1	44
BD170 + HB101 (pGB809) AS43	+ mini-pC194	38
BD170 + HB101 (pGB809) AS43	+ pUB110	12
BD170 + HB101 (pGB809) AS43-70	+ pC194	8
HB101 (pGB809) AS43	+ pC194	11
HB101 (pGB809) AS43-70	+ pC194	8

Die beiden *E.coli* Extrakte HB101(pGB809) AS43 und HB101(pGB809) AS43-70 replizieren keine exogen zugesetzte pC194-DNA. Ebenfalls keine pC194-Replikation konnte im *B.subtilis* Rohextrakt BD170 beobachtet werden. Allerdings kann durch Zugabe des *E.coli* Extraktes HB101(pGB809) AS43 eine Stimulierung der DNA-Synthese auf das siebenfache erzielt werden. In diesem komplementierten Replikationssystem replizierten nur die verwandten Plasmide pC194, pC194-1 und mini-pC194, nicht aber pUB110.
Der Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die pC194-Replikation im komplementierten *in vitro* System zeigt Tab.10. Der zweite *E.coli* Extrakt, HB101(pGB809) AS43-70, zeigte dagegen keine stimulierende Wirkung auf die pC194-Replikation im BD170 Extrakt.

Tab.10: Reaktionsbedingungen der Replikation von exogener pC194-DNA im zellfreien B.subtilis-Rohextrakt BD170 komplementiert mit dem E.coli-Extrakt HB101(pGB809) AS43

Reaktionsbedingungen Inhibitoren	DNA-Synthese (%)
komplettes System	100
+ araCTP	24
+ HPUra (1 mM)	22
+ Novobiocin	59
+ Phosphonoessigsäure	81
+ Phosphonoacetat	92
+ Rifampicin	87
- ATP,GTP,CTP,UTP	12
- GTP,CTP,UTP	21
- ATP	14

Der 100% Wert entspricht einem Einbau von 45 pMol dTMP. Die Extrakte wurden zusammen mit den jeweiligen Inhibitoren fünf Minuten auf Eis gestellt bevor die Reaktion gestartet wurde. Pro Ansatz wurde 1 µg pC194-DNA eingesetzt. Die Daten verstehen sich als Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

Die Resultate, die in diesem komplementierten Replikationssystem beobachtet werden, stimmen mit den in Tabelle 8 zusammengefaßten Ergebnissen über die endogene pC194-Replikation in B.subtilis Rohextrakten weitgehend überein:

1) Die pC194-Replikation ist rNTP-abhängig.

2) Die weitgehende Hemmung der DNA-Synthese durch araCTP und HPUra beweist eine Beteiligung der DNA-Polymerase III. Andererseits wird die DNA-Polymerase I nicht benötigt (vgl. die Daten für PAA und PPA).

3) Durch Novobiocin (Inhibitor der DNA-Gyrase) tritt nur eine geringe Inhibierung der Plasmid-Replikation auf.

4) Aus der weitgehenden Insensitivität der pC194-Replikation gegenüber Rifampicin folgt, daß die RNA-Polymerase von B.subtilis keine Funktion bei der Plasmidreplikation ausübt.

5. DISKUSSION

Das Plasmid pC194 wurde 1982 von Horinouchi und Weisblum vollständig sequenziert. Dabei wurden vier offene Leserahmen gefunden, von denen der Leseraster B als kodogene Sequenz für die Chloramphenicol-Acetyltransferase fungiert. Der Leserahmen D wurde von der Arbeitsgruppe Trautner durch eine pC194 Mutante, die zwei zusätzliche AT Basenpaare in Postion 2711 und 2713 besitzt, näher charakterisiert (Alonso und Trautner 1985a). Die Ergebnisse deuten auf die Beteiligung dieser DNA-Sequenz an der Plasmidstabilität hin. (Alonso und Trautner 1985b,c).
Der offene Leserahmen C dagegen könnte für eine Replikationsfunktion - eventuell für ein Initiationsprotein - kodieren (Horinouchi und Weisblum 1982). In dieser Arbeit wurde deshalb das Cistron C in den E.coli Vektor pUC18 kloniert (vgl. Abschnitt 4.3.), um das Genprodukt C überzuproduzieren und näher zu charakterisieren. Allerdings konnte bei keinem rekombinanten Bakterienklon die Produktion eines derartigen ´ C-Proteins´ nachgewiesen werden, auch nicht nach der Deletion von möglichen regulatorischen Elementen (z.B. Promotor des Cistrons C, Regulationssignale auf Translationsebene - Gold et al. 1981), die vor dem Leseraster liegen könnten. Dieses negative Ergebnis kann natürlich nur als Indiz für die Nichtexistenz eines C-Proteins angesehen werden. Denkbar wäre auch eine eventuelle Schädigung der Wirtszelle durch das überexprimierte Genprodukt C, so daß eine Selektion gegen die Expression des Proteins stattfände. In diesem Fall würden nur die Bakterienzellen überleben, die das Genprodukt C kaum oder gar nicht exprimieren. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß der Abstand zwischen der Ribosombindungsstelle (Shine und Dalgarno 1974) des Vektors pUC18 und dem ATG Startcodon des Leserasters C eine optimale Distanz von 6 - 8 Bp zur Translation aufweisen sollte (Gold et al. 1981). Eine weitere Ursache für die fehlende Überexpression des Genprodukts C könnte in dem Abbau eines derartigen pC194 Proteins, das ursprünglich aus B.subtilis stammt, im hetero-

logen E.coli System liegen. Die DNA würde dann zwar transkribiert und translatiert werden, aber das C-Protein würde von E.coli Proteasen als fremd erkannt und abgebaut werden. Andererseits stimmt das Resultat mit der Arbeit von Dagert et al. (1984) überein, in der gezeigt wurde, daß auf dem DNA-Abschnitt, auf dem der Leserasters C liegt, höchstwahrscheinlich kein Protein, wohl aber eine andere Replikationsfunktion (eventuell ein RNA-Transkript oder der Origin) kartiert. Gleichzeitig wurde durch in vivo Versuche (Kotransduktion mit M13-Phagen) das Leseraster A als DNA-Sequenz erkannt, die für ein Replikationsprotein kodiert.
Deshalb erschien es sinnvoll, das Gen A zu klonieren, um dieses Protein überzuproduzieren, anzureichern und zum Aufbau eines in vitro Replikationssystem zu verwenden. Da für B.subtilis keine geeigneten Expressionsvektoren vorhanden waren, wurde das Cistron A in den E.coli Expressionsvektor pJF118(E,H) hinter den tac-Promotor kloniert (vgl. Abschnitt 4.2.). Eine starke Überproduktion des Genprodukts A in dem Stamm HB101(pGB809) konnte nach Induktion des tac-Promotors mit IPTG beobachtet werden, nachdem 155 Basenpaare, die vor dem Leseraster A lagen (zwischen BglI und DdeI Schnittstelle), deletiert worden waren. Folglich müssen auf diesem DNA-Segment Signale liegen, die die Expression des Proteins negativ regulieren. Bei der genaueren Untersuchung dieser DNA-Region fielen verhältnismäßig viele repetitive Sequenzen auf, die ausgeprägte Sekundärstrukturen ausbilden können (Horinouchi und Weisblum 1982). Einige dieser DNA-Strukturen könnten an der Regulation des proteineigenen Promotors beteiligt sein und zu einem vorzeitigen Transkriptionsstop führen (Platt 1981, Holmes et al. 1983); auch eine Regulation des Genprodukts A auf Translationsebene wäre vorstellbar (Moran et al. 1982). Das nach IPTG-Induktion gefundene Protein besaß ein Molekulargewicht von 33.000 d, das mit dem aus der DNA-Sequenz berechneten Wert von 34.152 d sehr gut übereinstimmt. Das Protein wurde gemäß den in vivo Versu-

chen von Iordanescu und Surdeanu (1983) als RepH-Protein bezeichnet.
Bei der Klonierung des RepH-Gens wurden nur sehr niedrige Transformationsraten erzielt, und es traten unverhältnismäßig viele Deletionsmutanten auf. Dies führte zu der Vermutung, daß das RepH-Protein eventuell eine für die E.coli Zelle schädliche Auswirkung besitzt. Eine Überproduktion eines derartigen Replikationsproteins könnte in der Wirtszelle zu einer Störung des Replikationsapparates der Zelle und damit der chromosomalen Replikation führen. So liegen viele plasmidkodierte Initiationsproteine in limitierten, sehr niedrigen Proteinkonzentrationen in der Wirtszelle vor; so z.B. die drei Rep-Proteine des E.coli Plasmids RSF1010 (Scholz et al.), das Pi-Protein des E.coli Plasmids R6K (Inuzuka und Helinski 1978b) oder das RepC-Protein des S.aureus Plasmids pT181 (Novick et al. 1982). Diese Proteine regulieren über ihre Expression die Replikationsrate der Plasmide. Andererseits könnte das A1-Fragment auch Signalstrukturen auf der DNA-Ebene tragen, die für die Plasmidreplikation von Bedeutung sind (z.B. den Origin) und damit die vielen Deletionen bedingen. Durch die Davorschaltung des starken tac-Promotors würde dessen Transkription dann mit der Plasmidreplikation interferieren (Gentz et al. 1981).

Um die Funktionalität des klonierten RepH-Proteins nachzuweisen, wurde eine RepH-Mutante (pHV14ΔNsiI) des Plasmids pHV14 (vgl. Abschnitt 4.2.) in trans durch das Genprodukt A des Plasmids pGB8091 komplementiert, das ein Hybrid aus dem B.subtilis Plasmid pUB110 (siehe Abb.22) und dem das RepH-Gen exprimierenden Plasmid pGB809 (siehe Abb.17) darstellt. Der in vivo Nachweis erfolgte durch Kotransformation von kompetenten B.subtilis Zellen mit den beiden Plasmiden. Das Ergebnis des Versuches bewies, daß das klonierte A1-Fragment tatsächlich ein intaktes, aktives Replikationsprotein (RepH) exprimiert.
Da der Promotor des RepH-Gens bei der Klonierung in den Vektor pJF118(E,H) deletiert worden war, erfolgte die Ex-

pression des RepH-Proteins über den tac-Promotor. Das Experiment zeigte also, daß der synthetisch konstruierte tac-Promotor aus E.coli (deBoer et al. 1983) auch von der B.subtilis RNA-Polymerase erkannt wird. Normalerweise funktionieren E.coli Promotoren nicht in B.subtilis (Shorenstein et al. 1973, Stallcup et al. 1974, Ehrlich 1978); die Ursache dafür liegt in der hohen Spezifität der B.subtilis RNA-Polymerase für B.subtilis Promotoren (Moran et al. 1982, Kreft et al. 1983). Dagegen stellt umgekehrt die Expression von B.subtilis Genen in E.coli kein Problem dar, denn die E.coli RNA-Polymerase besitzt nicht dieselbe hohe Spezifität. Eine Ausnahme scheint demnach der tac-Promotor darzustellen, der mit seiner ´consensus´Sequenz (.TTGACA...TATAAT, de Boer et al.) auch von der B.subtilis RNA-Polymerase transkribiert wird. Über die Stärke des tac-Promotors in B.subtilis im Vergleich zu E.coli trifft dieses Experiment allerdings keine Aussage, denn die in vivo Komplementation der RepH-Mutante in B.subtilis wird auch schon durch niedrige RepH-Konzentrationen ermöglicht.

In dieser Arbeit wurde ein B.subtilis in vitro Replikationsystem für das Plasmid pC194 aufgebaut, zu dem zellfreie Rohextrakte plasmidhaltiger Bakterienkulturen verwendet wurden (vgl. Abschnitt 4.4.1.). DNA-Synthese konnte nur gemessen werden wenn das Plasmid endogen in den Extrakten vorlag, nicht dagegen wenn B.subtilis Extrakte exogen mit pC194-DNA versetzt wurden. Dieser Befund im Zusammenhang mit der leicht erhöhten Plasmidreplikation bei Verwendung der Kopienzahl-Mutante pC194-1 deuten darauf hin, daß ein plasmidkodierter Faktor die Replikation positiv reguliert. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Iordanescu und Surdeanu (1983) und von Dagert et al. (1984) überein, die aus ihren in vivo Experimenten die Existenz eines Replikationsproteins (RepH) vorhersagten. Es zeigte sich, daß die endogene pC194-Replikation in B.subtilis - vergleichbar mit ColE1 in E.coli - alle vier rNTP´s erfordert; eine Evidenz für die Initiation der DNA-Synthese über einen RNA-Primer (Staudenbauer 1975). Im

Gegensatz zum ColE1-System ist die pC194-Replikation aber weitgehend resistent gegen die RNA-Polymerase Inhibitoren Rifampicin (Murray und Rabinowitz 1981) und Streptolydigin (Cassani 1971). Das bedeutet, daß der RNA-Primer von einem Rifampicin- und Streptolydigin-resistenten Enzym synthetisiert wird. Diese Initiationsfunktion könnte z.B. das plasmidkodierte RepH-Protein wahrnehmen. Allerdings kann die Möglichkeit der Primer-Synthese durch eine resistente B.subtilis Primase nicht ausgeschlossen werden. Die Vermutung, daß nur die Elongation von schon initiierten Replikationsgabeln beobachtet wird und keine de novo Initiation (Benjamin et al. 1982, Khan et al. 1981), wurde durch Verwendung des Miniplasmids (mini-pC194) widerlegt, das exogen zugegeben ebenso wie das endogene pC194-Plasmid repliziert wird.

Die Hemmung der Proteinbiosynthese durch die beiden Antibiotika Kanamycin und Streptomycin beeinflußt weder die pC194-Replikation in B.subtilis noch die ColE1-Synthese in E.coli.

An der Plasmidreplikation war die DNA-Polymerase III von B.subtilis beteiligt, wie die Versuche mit den Inhibitoren araCTP, HPUra, NEM und PAA zeigten. Allerdings konnte wegen der nicht vollständigen Hemmung durch araCTP und HPUra die Beteiligung der DNA-Polymerase II nicht ausgeschlossen werden. Dies Ergebnis steht im Gegensatz zum ColE1-System, das sowohl die DNA-Polymerase III (Inhibierung durch araCTP) als auch die Polymerase I benötigt (Inhibierung durch PAA).

Ein weiterer Unterschied der pC194 DNA-Synthese zum ColE1-System in E.coli besteht in der nur partiellen Hemmung der pC194-Replikation durch Hemmstoffe der DNA-Gyrase (Novobiocin, Coumermycin, Nalidixinsäure und Oxolinsäure - Orr und Staudenbauer 1982). Andererseits zeigte die Inhibierung der Plasmid-Replikation durch Relaxierung der Plasmid-DNA durch die Endonuklease aus Neurospora crassa, daß die Superhelizität der DNA sehr wohl von Bedeutung ist, und daß die gemessene DNA-Synthese keine Reparatur-

synthese darstellt, denn eine Reparatur von DNA-Molekülen sollte auch an relaxierter DNA ablaufen. Diese Resultate lassen sich am einfachsten damit erklären, daß die Gyrase zwar für die Maturation der getwisteten Plasmid-Monomere benötigt wird, nicht aber für die Initiation bzw. Elongation der pC194-Replikation. Damit scheint das B.subtilis Plasmid pC194 nach einem grundlegend anderen Mechanismus zu replizieren als z.B. das E.coli Plasmid ColE1, dessen Initiation über die Synthese eines RNA-Primers durch die RNA-Polymerase und der Primer-Verlängerung durch die DNA-Polymerase I erfolgt. Die Elongation der ColE1-DNA übernimmt dann die DNA-Polymerase III (Staudenbauer 1978).

Um über die Funktion des RepH-Proteins eine Aussage treffen zu können, wurden aus E.coli Zellen, die plasmidkodiert (pGB809) das RepH-Protein überproduzieren, Ammoniumsulfat-Fraktionen hergestellt. Diese Proteinfraktionen, die selbst keine Replikationsaktivität mit dem exogen zugesetzten Plasmid pC194 zeigten, wurden zur Komplementierung eines plasmidfreien B.subtilis Rohextraktes verwendet (vgl. Abschnitt 4.4.3.). Exogen zugegebene pC194-DNA wurde in diesem komplementierten System repliziert. Dieser Versuch beweist eindeutig die Abhängigkeit der pC194-Replikation vom RepH-Protein.

Die Reaktionsbedingungen und die Beteiligung von B.subtilis Replikationsenzymen an der DNA-Synthese von exogen eingesetzter pC194-DNA stimmten mit den Bedingungen für die endogene Plasmidreplikation überein (vgl. Abschnitte 4.4.2. umd 4.5.). Die DNA-Synthese ist rNTP-abhängig, benötigt die DNA-Polymerase III, aber keine DNA-Gyrase. Die Initiation der pC194-Replikation erfolgt über einen Rifampicin-resistenten Mechanismus. Rifampicin-Resistenz wurde auch schon für weitere in vitro Replikationssysteme beschrieben; so z.B. für das Plasmid miniR1 in E.coli (Diaz und Ortega 1984) und für das Plasmid pT181 in zellfreien Extrakten von S.aureus (Khan et al. 1981). Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang die am Plasmid pT181 durchgeführten Studien. Das Plasmid stammt

ebenso wie pC194 aus dem grampositiven Bakterium S.aureus. Das in vitro System wird ebenfalls nur partiell durch Rifampicin und Novobiocin gehemmt. pT181 kodiert gleichfalls für ein Replikationsprotein (RepC), das die Initiationsfrequenz in Abhängigkeit von seiner Konzentration in der Wirtszelle positiv reguliert (Khan et al. 1983). Dieses RepC-Protein besitzt eine pT181 Origin-spezifische Topoisomerase-Aktivität (Koepsel et al. 1985). Es wurde vermutet, daß die pT181-Replikation nach dem ´ Rolling circle´ Mechanismus abläuft (Khan et al. 1983). Das RepC-Protein würde über seine Topoisomerase-Aktivität einen Einzelstrangbruch in die Plasmid-DNA im Origin-Bereich einführen, der als Startpunkt für die Elongation dienen könnte. Die Regulation der pT181-Replikation erfolgt über das positiv agierende RepC-Protein, das anhand des in vitro Replikationssystems gereinigt wurde (Koepsel et al. 1985). Die Transkription des Proteins erfolgt über zwei Messenger (RNA III,IV), die ihrerseits von zwei gegenläufigen, 85 und 150 Bp kurzen Inhibitor-RNA´s (RNA I,II), die als ´Countertranskripte´ bezeichnet werden, über RNA/RNA-Wechselwirkungen negativ reguliert werden (Kumar und Novick 1984, Novick et al. 1984, Carleton et al. 1984).

Ein Vergleich der Situation des Plasmids pC194 in B.subtilis zeigt starke Ähnlichkeiten mit den Replikationsverhältnissen des Plasmids pT181 in S.aureus: So zeigen beide in vitro Replikationssysteme eine weitgehende Insensitivität gegen die Antibiotika Rifampicin und Novobiocin. Außerdem kodieren beide Plasmide für je ein Replikationsprotein, das die Plasmidreplikation positiv steuert. Daher liegt die Vermutung auf eine weiterreichende Homologie nahe, die sich auch auf den Replikationsmodus erstrecken könnte. Ein ´Rolling circle´ Mechanismus würde erklären, warum für die Verdopplung der pC194-DNA keine Aktivierung des Origins durch eine wirtskodierte RNA-Polymerase notwendig ist, und warum auch die B.subtilis DNA-Gyrase entbehrlich ist.

Die Bestimmung des pC194 Origins (vgl. Abschnitt 3.8.2.) führte zu einer ungewöhnlich niedrigen Ausbeute an Replikations-Intermediaten. Von daher ergab sich ein statistisch noch nicht genügend abgesichertes Ergebnis, demnach läge der Replikationsursprung in Position 600 ± 100 Bp (Daten nicht gezeigt). Dabei würde der Origin innerhalb des Leserasters des RepH-Proteins zu liegen kommen (siehe Abb.1). Vergleichbar ist auch hier wieder die Situation im Plasmid pT181, dessen Origin innerhalb des RepC-Gens liegt und mit Hilfe des in vitro Replikationssystems in S.aureus bestimmt worden war (Khan et al. 1982). Die Annahme, daß auch das Plasmid pC194 nach dem ´rolling circle´ Mechanismus repliziert, würde zwanglos die schlechte Ausbeute an replikativen Intermediaten bei der Bestimmung des pC194-Origins erklären. Replikative Intermediate würden dann nicht wie bei E.coli Plasmiden aus ringförmiger, doppelsträngiger DNA mit Theta-Strukturen (Stuitje et al. 1979, Eichenlaub et al. 1980, Scheer-Abramowitz et al. 1981) bestehen. Vielmehr würde die DNA-Synthese an einem einzelsträngigen Plasmidring unter Abschälung des zweiten Stranges erfolgen. Diese DNA-Formen würden dann in einer CsCl-Gleichgewichtszentrifugation größtenteils noch unterhalb der superhelikalen Plasmid-Bande vorzufinden sein. In der Arbeit von Riele et al. wird gezeigt,daß pC194, pT181 und vier weitere S.aureus und B.subtilis Plasmide nicht nur als zirkuläre Doppelstrangmoleküle sondern auch als ringförmige Einzelstränge in der Wirtszelle vorliegen. Diese Einzelstränge könnten als Zwischenstufe in der Plasmidreplikation angesehen werden. Demnach wäre dieser Replikationsmechanismus nicht ein Ausnahmefall für das Plasmid pT181 in S.aureus und eventuell für pC194 in B.subtilis sondern könnte den Regelfall in der Plasmidreplikation in den beiden grampositiven Bakterien darstellen.

Ein interessanter Nebenaspekt dieser Arbeit stellt die Aktivität des tac-Promotors in B.subtilis dar. In diesem Zusammenhang wäre die Bestimmung der Promotor-Stärke in

B.subtilis im Vergleich zu E.coli von großem Interesse und könnte zur Entwicklung von B.subtilis Expressionsvektoren beitragen.

Das in dieser Arbeit entwickelte B.subtilis in vitro Komplementationssystem sollte als Nachweis-Test die Reinigung des RepH-Proteins ermöglichen. Durch Verwendung von Didesoxyribonukleosid-Triphosphaten im in vitro Replikationssystem sollte es außerdem gelingen, replikative Intermediate anzureichern und den Origin des Plasmids zu kartieren. Anschließend könnten Wechselwirkungen zwischen plasmidkodiertem Replikationsprotein zum pC194-Origin studiert werden, die der Aufklärung des Initiationsmechanismus dienen. Damit gekoppelt scheint die Untersuchung der Regulation der pC194-Replikation, wobei die Frage nach den Replikationsbarrieren zwischen dem grampositiven Bakterium B.subtilis und dem gramnegativen E.coli aufgeworfen wird.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Der offene Leseraster C des Plasmids pC194 wurde in den Vektor pUC18 kloniert, der Leserahmen A in den Expressionsvektor pJF118(E,H). Nach Elimination von Kontrollsignalen konnte das Genprodukt A nach Induktion des tac-Promotors als Protein von 34.000 d nachgewiesen werden. Kein Protein wurde für den Leserahmen C gefunden.

2. Mutanten des Plasmids pHV14, die eine Deletion im Leseraster A tragen, sind in B.subtilis nicht replikationsfähig. Das bedeutet, daß der Leserahmen A für eine essentielle Replikationsfunktion (RepH) kodiert. In vivo Komplementation der Mutante durch das RepH-Gen in trans beweist die Funktionalität des klonierten Gens in B.subtilis.

3. Ein in vitro Replikationssystem für das Plasmid pC194 wurde in zellfreien Extrakten aus B.subtilis aufgebaut. Endogene pC194-DNA repliziert rNTP-abhängig zur superhelikalen cc-Form. Die DNA-Synthese ist im Gegensatz zu ColE1 resistent gegen Rifampicin und gegen verschiedene Gyrase-Inhibitoren. Die Replikation von exogen zugegebener mini-pC194 DNA beweist die Fähigkeit des Replikationssystems zur de novo Initiation.

4. Eine angereicherte RepH-Protein Fraktion aus E.coli wurde verwendet, um einen zellfreien B.subtilis Rohextrakt in vitro zu komplementieren. Die DNA-Replikation erfolgt spezifisch für das Plasmid pC194 und seine Derivate.

7. ABKÜRZUNGEN:

AS43	Ammoniumsulfat-Fraktion (0-43%)
bp	Basenpaar
B.subtilis	Bacillus subtilis
cc	superhelikale DNA (closed circular)
d	Dalton
dNTP`s	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
ds	doppelsträngig
E	Einheit
E.coli	Escherichia coli
MCS	Polylinker (multi cloning site)
oc	offen zirkuläre DNA (open circular)
OD_{600}	Optische Dichte, gemessen bei 600 nm
RF	Replikative Form
rNTP`s	Ribonukleosid-Triphosphate
S.aureus	Staphylococcus aureus
ss	einzelsträngig (single-stranded)
Upm	Umdrehungen pro Minute

8. LITERATURVERZEICHNIS

Alonso,J.C., Trautner,T.A.: A gene controlling segregation of the Bacillus subtilis plasmid pC194. Mol.Gen.Genet. 198, 427-431 (1985a)

Alonso,J.C., Trautner,T.A.: Generation of deletions through a cis-acting mutation in plasmid pC194. Mol.Gen.Genet. 198, 432-436 (1985b)

Alonso,J.C., Trautner,T.A.: Cold sensitivity in the transfer of a plasmid with a deletion hot spot into recombination deficient B.subtilis cells. Mol.Gen.Genet. 198, 437-440 (1985c)

Alton,N.K., Vapnek,D.: Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9. Nature 282, 864-871 (1979)

Amann,E., Brosius,J., Ptashne,M.: Vectors bearing a hybrid trp-lac promotor useful for regulated expression of cloned genes in Escherichia coli. Gene 25, 167-178 (1983)

Aoyama,T., Takanami,M., Ohtsuka,E., Taniyama,Y., Marumoto,R., Sato,H., Ikehara,M.: Essential structure of E.coli promoter: Effect of spacer length between the two consensus sequences on promoter function. Nucl.Acids Res. 11, 5855-5864 (1983)

Appleyard,R.K.: Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from Escherichia coli. Genetics 39, 440-442 (1954)

Band,L., Henner,D.J.: Bacillus subtilis requires a stringent Shine-Dalgarno region for gene expression. DNA 3, 17-21 (1984)

Barany,F., Tomasz,A.: Genetic transformation of Streptococcus pneumoniae by heterologous plasmid deoxyribonucleicacid. J.Bacteriol. 144,968-970 (1980)

Bazill,G.W., Karamata,D.: Temperature-sensitive mutants of Bacillus subtilis defective in DNA synthesis. Mol.Gen.Genet. 117, 19-29 (1972)

Benjamin,P., Strumph,P., Kenny,M., Firshein,W.: DNA synthesis in purified DNA-membrane complexes extracted from a Bacillus subtilis polA mutant. Nature 298, 769-771 (1982)

Berk,A.J., Sharp,P.A.: Sizing and mapping of early Adenovirus mRNAs by gelelectrophoresis of S1 endonuclease digested hybrids. Cell 12, 721-732 (1977)

Birnboim,H.C., Doly,J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl.Acids Res. 7, 1513-1523 (1979)

Biolabs-Katalog (1983/4)

Boehringer-Katalog (1983)

Bolivar,F., Rodriguez,R.L., Greene,P.J., Betlach,M.C., Heyneker,H.L., Boyer,H.W., Crosa,J.H., Falkow,S.: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene 2, 95-113 (1977)

Boyer,H.W., Roulland-Dussoix,D.: A complementation analyses of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. J.Mol.Biol. 41, 459-463 (1969)

BRL-Katalog (1983)

Brosius,J., Dull,T.J., Sleeter,D.D., Noller,H.F.: Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from E.coli. J.Mol.Biol. 148, 107-127 (1981)

Brown,N.C.: Inhibition of bacterial DNA replication by 6-(p-Hydroxyphenylazo)-uracil: Differential effect on repair and semi-conservative synthesis in Bacillus subtilis. J.Mol.Biol. 59, 1-16 (1971)

Brown,B.J., Carlton,B.C.: Plasmid-mediated transformation in Bacillus megaterium. J.Bacteriol. 142, 508-512 (1980)

Canosi,U., Mazza,G., Tailor,R.: Identification of a mutation in a Bacillus subtilis plasmid affecting host sensitivity to methyl methane sulfonate. In: Genetic exchange: A celebration and a new generation.Genetic and cellular

technology Vol.1:Streips,U.N., Goodgal,S.H., Guild,W.R., Wilson,G.A.(eds).Marcel Dekker Inc., New Yorck, Basel, 107-116 (1982)

Carleton,S., Projan,S.J., Highlander,S.K., Moghazeh,S.M., Novick,R.P.: Control of pT181 replication: II. Mutational analysis. EMBO J. 3, 2407-2414 (1984)

Cassani,G., Burgess,R.R., Goodman,H.M., Gold,L.: Inhibition of RNA-Polymerase by Streptolydigin. Nature New Biology 230, 197-200 (1971)

Chan,P.T., Ohmori,H., Tomizawa,J., Lebowitz,J.: J.Biol.Chem. 260, 8925-8928 (1985)

Chang,S., Cohen,S.N.: High frequency transformation of B.subtilis protoplasts by plasmid DNA. Mol.Gen.Genet. 168, 111-115 (1979)

Chirikjan,J.G., George,J.: in: Gene amplification and analysis. (ed) Chirikjan,J.G., Vol.I Elsevier North Holland Inc. New Yorck, New Yorck, 74-76 (1981)

Clewell,D.B., Helinski,D.R.: Supercoiled circular DNA-protein complex in Escherichia coli: Purification and induced conversion to an open circular form. Proc.Natl.Acad.Sci. 62, 1159-1166 (1969)

Cozzarelli,N.R.: The mechanism of action of inhibitors of DNA synthesis. Ann.Rev.Biochem. 46, 641-668 (1977)

Dagert,M., Jones,I., Goze,A., Romac,S., Niaudet,B., Ehrlich,S.D.: Replication functions of pC194 are necessary for efficient plasmid transduction by M13 phage. EMBO Journal 3, 81-86 (1984)

Danner,D.B.: Recovery of DNA fragments from gels by transfer to DEAE-paper in an electrophoresis chamber. Anal.Biochem. 125, 139-142 (1982)

de Boer,H.A., Comstock,L.J., Yansura,D.G., Heynecker,H.L.: Construction of a tandem trp-lac promoter and a hybrid trp-lac promoter for efficient and controlled expression of the human growth hormone gene in Escherichia coli. in:

Rodriguez,R.L., Chamberlin,M.J. (Eds.) Promoters, structure and function. Praeger, New York, 462-481 (1982)

de Boer,H.A., Comstock,L.J., Vasser,M.: The tac promotor: A functional hybrid derived from the trp and lac promotors. Proc.Natl.Acad.Sci. 80, 21-25 (1983)

Diaz,R., Nordström,K., Staudenbauer,W.L.: Plasmid R1 DNA replication dependent on protein synthesis in cell-free extracts of E.coli. Nature 289, 326-328 (1981)

Diaz,R., Ortega,S.: Initiation of plasmid R1 replication in vitro is independent of transcription by host RNA polymerase. Nucl.Acids Res. 12, 5175-5191 (1984)

Diaz,R., Staudenbauer,W.L.: Replication of the broad host range plasmid RSF1010 in cell-free extracts of Escherichia coli and Pseudomonas aeroginosa. Nucl.Acids Res. 10, 4687-4701 (1982)

di Jeso,F.: Ammoniumsulfat concentration conversion nomograph for 0^{o}C. J.Biol.Chem. 243, 2022-2023 (1963)

Dubnau,D., Gryczan,T., Contente,S., Shivakumar,A.G.: Molecular cloning in Bacillus subtilis. Genetic Engineering 2, 115-131 (1980)

Dubnau,D., Cirigliano,C.: Genetic characterization of recombination-deficient mutants of Bacillus subtilis. J.Bact. 117, 488-493 (1974)

Efstratiadis,A., Vournakis,J.N., Keller,H.D., Chaconas,D., Dougall,D.K., Kafatos,F.C.: End labelling of enzymatically decapped mRNA. Nucl.Acids Res.4, 4165-4174 (1977)

Ehrlich,S.D.: Replication and expression of plasmids from Staphylococcus aureus in Bacillus subtilis. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 1680-1682 (1977)

Ehrlich,S.D.: DNA cloning in Bacillus subtilis. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75, 1433-1436 (1978)

Ehrlich,S.D., Jupp,S., Niaudet,B., Goze,A.: Bacillus subtilis as a host for DNA cloning. North Holland Biomedical Press 25-32 (1978)

Ehrlich,S.D., Niaudet,B., Michel,B.: Use of plasmids from Staphylococcus aureus for cloning of DNA in Bacillus subtilis. Current Topics Microbiol. Immunol. 96, 19-29 (1981)

Eichenlaub,R., Sparks,R.B., Helinski,D.R.: Bidirectional replication of the mini-ColE1 plasmid pVH51. J.Bact. 138, 257-260 (1980)

Ellis,D.M., Kaelbling,M.J., Dean,D.H.: The Bacillus genetic stock center - Catalog of strains. 2.Auflage (1981)

Gass,K.B., Cozzarelli,N.R.: Further genetic and enzymological characterization of the three Bacillus subtilis DNA polymerases. J.Biol.Chem. 248, 7688-7700 (1973)

Gass,K.B., Low,R.L., Cozzarelli,N.R.: Inhibition of a DNA polymerase from Bacillus subtilis by hydroxyphenylazopyrimidines. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70, 103-107 (1973)

Gentz,R., Langner,A., Chang,A.C.Y., Cohen,S.N., Bujard,H.: Cloning and analysis of strong promoters is made possible by the downstream placement of a RNA termination signal. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78, 4936-4940 (1981)

Gilbert,W.: Starting and stopping sequences for the RNA polymerase. in: Losick,R., Chamberlin,M. (Eds.) RNA polymerase. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 193-205 (1976)

Gold,L., Pribnow,D., Schneider,T., Shinedling,S., Singer,B.S., Stormo,G.: Translational initiation in prokaryotes. Ann.Rev.Microbiol. 35, 365-403 (1981)

Goursot,R., Goze,A., Niaudet,B., Ehrlich,S.D.: Plasmids from Staphylococcus aureus replicate in yeast Saccharomyces cerevisiae. Nature 298, 488-490 (1982)

Goze,A., Ehrlich,S.D.: Replication from plasmids from Staphylococcus aureus in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7333-7337 (1980)

Gryczan,T.J., Contente,S., Dubnau,D.; Characterization of Staphylococcus aureus plasmids introduced by transformation into Bacillus subtilis. J.Bacteriol. 134, 318-329 (1978)

Guerry,P., LeBlanc,D.J., Falkow,S.: General method for the isolation of plasmid DNA. J.Bacteriol. 116, 1064-1066 (1973)

Hanahan,D.: Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J.Mol.Biol. 166, 557-580 (1983)

Holmes,W.M., Platt,T., Rosenberg,M.: Termination of transcription in E.coli. Cell 32, 1029-1032 (1983)

Holmes,D.S., Quigley,M.: A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal.Biochem. 114, 193-197 (1981)

Horinouchi,S., Weisblum,B.: Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. J.Bacteriol. 150, 815-825 (1982a)

Horinouchi,S., Weisblum,B.: Control of gene expression and replication in plasmids pE194 and pC194. in: Molecular cloning and gene regulation in Bacilli. Academic press Inc. 287-300 (1982b)

Humphreys,G.O., Willshaw,G.A., Anderson,E.S.: A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA. Biochim.Biophys.Acta 383, 457-463 (1975)

Inuzuka,M., Helinski,D.R.: Replication of antibiotic resistance plasmid R6K DNA in vitro. Biochem. 17, 2567-2573 (1978a)

Inuzuka,M., Helinski,D.R.: Requirement of a plasmid-encoded protein for replication in vitro of plasmid R6K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5381-5385 (1978b)

Iordanescu,S.: Recombinant plasmid obtained from two different, compatible Staphylococcal plasmids. J.Bacteriol. 124, 597-601 (1975)

Iordanescu,S., Surdeanu,M.: Isolation and complementation of temperature-sensitive replication mutants of Staphylococcus aureus plasmid pC194. Mol.Gen.Genet. 191, 201-206 (1983)

Isaacs,S.T., Shen,C.J., Mearst,J.E., Rapoport,H.: Synthesis and characterization of new psoralen derivatives with superior photoreactivity with DNA and RNA. Biochemistry 16, 1058-1064 (1977)

Jalanko,A., Palva,I., Söderlund,H.: Restriction maps of plasmid pUB110 and pBD9. Gene 14, 325-328 (1981)

Khan,S.A., Adler,G.K., Novick,R.P.: Functional origin of replication of pT181 plasmid DNA is contained within a 168-base pair segment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4580-4584 (1982)

Khan,S.A., Carleton,S.M., Novick,R.: Replication of plasmid pT181 DNA in vitro: Requirement for a plasmid-encoded product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4902-4906 (1981)

Khan,S.A., Novick,R.P.: Complete nucleotide sequence of pT181, a Tetracycline-resistance plasmid from Staphylococcus aureus. Plasmid 10, 251-259 (1983)

Koepsel,R.R., Murray,R.W., Rosenblum,W.D., Khan,S.A.: Purification of pT181-encoded repC protein required for the initiation of plasmid replication. J.Biol.Chem. 260, 8571-8577 (1985)

Kornberg,A.: DNA-Replication. (ed.) Freeman,W.H. and Co., San Francisco 1st ed. 1974, 2nd 1980)

Kreft,J., Burger,K.J., Goebel,W.: Expression of antibiotic resistance genes from Escherichia coli in Bacillus subtilis. Mol.Gen.Genet. 190, 384-389 (1983)

Kumar,C.C., Novick,R.P.: Plasmid pT181 replication is regulated by two countertranscripts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 638-642 (1985)

Lacatena,R.M., Cesareni,G.: The interaction between RNA1 and the Primer precursor in the regulation of ColE1 replication. J.Mol.Biol. 170, 635-650 (1983)

Lacey,R.W., Chopra,I.: Genetic studies of a multiresistant strain of Staphylococcus aureus. J.Med.Microbiol. 7, 285-297 (1974)

Lämmli,U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970)

Light,J., Molin,S.: Expression of a copy number control gene (copB) of plasmid R1 is constitutive and growth rate dependent. J.Bacteriol. 151, 1129-1135 (1982a)

Light,J., Molin,S.: The sites of action of the two copy number controll functions of plasmid R1. Mol.Gen.Genet. 187, 486-493 (1982b)

Löfdahl,S., Sjöström,J.E., Philipson,L.: Characterization of small plasmids from Staphylococcus aureus. Gene 3, 149-159 (1978)

Lovett,P.S., Keggins,K.M.: Bacillus subtilis as a host for molecular cloning. in: Methods in Enzymologie 68, 342-357 (1979)

Low,B.: Formation of merodiploids in matings with a class of rec$^-$ recipient strains of Escherichia coli K12. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 60, 160-174 (1968)

Luczak,H., Doktorarbeit, Technische Universität München (1985)

Maniatis,T., Fritsch,E.F., Sambroo,K.J.: Molecular cloning - A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New Yorck (1982)

Maniatis,T., Ptashne,M., Backman,K., Kleid,D., Flashman,S., Jeffrey,A., Maurer,R.: Recognition sequences of repressor and polymerase in the operators of the bacteriophage lambda. Cell 5, 109-113 (1975)

Martin,P.A., Lohr,J.R., Dean,D.H.: Transformation of Bacillus thuringiensis protoplasts by plasmid deoxyribonucleic acid. J.Bacteriol. 145, 980-983 (1981)

Messing,J., Gronenborn,B., Mueller-Hill,B., Hofschneider,P.H.: Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a HindII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 3642-3646 (1977)

Messing,J., Vieira,J.: A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. Gene 19, 269-276 (1982)

Moran,C.P., Lang,N., LeGrice,S.F., Lee,G., Stephens,M., Pero,J.I., Sonenshein,A.L., Losick,R.: Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in Bacillus subtilis. Mol.Gen.Genet. 186, 339-346 (1982)

Morris,C.F., Sinha,N.K., Alberts,B.M.: Reconstruction of bacteriophage T4 DNA replication apparatus from purified components: Rolling circle replication following de novo chain initiation on a single-stranded circular DNA template. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72, 4800-4804 (1975)

Murray,C.L., Rabinowitz,J.C.: RNA polymerase from Clostridium acidi-urici. J.Biol.Chem. 256, 5153-5161 (1981)

Nierhaus,K.H., Wittmann,H.G.: Ribosomal function and its inhibition by antibiotics in prokaryotes. Naturwissenschaften 67, 234-250 (1980)

Nordström,K.: Review - Control of plasmid replication. Plasmid 9,1-7 (1983)

Norrander,J.,Kempe,T.,Messing,J.: Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. Gene 26,101-106 (1983)

Novick,R.P., Adler,G.K., Khan,S.A., Carleton,S., Rosenblum,W., Iordanescu,S.: Coding sequence for the pT181 repC product: A plasmid-coded protein uniquely required for replication. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 4108-4112 (1982)

Novick,R.P., Adler,G.K., Projan,S.J., Carleton,S., Highlander,S., Gruss,A., Khan,S.A., Iordanescu,S.: Control of pT181 replication: I. The pT181 copy control function acts by inhibiting the synthesis of a replication protein. Embo J. 3, 2399-2405 (1984)

Orr,E., Staudenbauer,W.L.: Bacillus subtilis DNA gyrase: Purification of subunits and reconstitution of supercoiling activity. J.Bacteriol. 151, 524-527 (1982)

Polisky,B., Greene,P., Garfin,D.E., McCarthy,B.J., Goodman,H.M., Boyer,H.W.: Specificity of substrate recognition by the EcoRI restriction endonuclease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3310-3314 (1975)

Platt,T.: Termination of transcription and its regulation in the tryptophan operon of E.coli. Cell 24, 10-23 (1981)

Pratt,J.M., Boulnois,G.J., Darby,V., Orr,E., Wahle,E., Holland,I.B.: Identification of gene products programmed by restriction endonuclease DNA fragments using an E.coli in vitro system. Nucl.Acids Res. 9, 4459-4474 (1981)

Pribnow,D.: Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 1069-1072 (1975)

Rashbaum,S.A., Cozzarelli,N.R.: Mechanism of DNA synthesis inhibition by arabinosyl cytosine and arabinosyl adenine. Nature 264, 679-680 (1976)

Richardson,C.C., Lehman,I.R., Kornberg,A.: DNA-Phosphatase-Exonuclease from E.coli. J.Biol.Chem. 239, 251-258 (1964)

Riele,H., Michel,B., Ehrlich,S.D.: Single-stranded plasmid DNA in Bacillus subtilis and Staphylococcus aureus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA in Druck

Roberts,R.J.: Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. Nucl.Acids.Res. 12, r167-r204 (1984)

Rosenberg,M., Court,D.: Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. Ann.Rev.Genet. 13, 319-353 (1975)

Sancar,A., Hack,A.M., Rupp,W.D.: Simple method for identification of plasmid - coded proteins. J.Bacteriol. 137, 692-693 (1979)

Schaller,H., Gray,C., Herrmann,K.: Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site from the DNA of bacteriophage fd. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72, 737-741 (1975)

Scheer-Abramowitz,J., Gryczan,T.J., Dubnau,D.: Origin and mode of replication of plasmids pE194 and pUB110. Plasmid 6, 67-77 (1981)

Scholz,P., Haring,V., Scherzinger,E., Lurz,R., Bagdasarian,M.M., Schuster,H., Bagdasarian,M.: Replication determinants of the broad host-range plasmid RSF1010. in: Plasmids in bacteria. 243-259, (Eds.) Helinski,D.R., Cohen,S.N., Clewell,D.B., Jackson,D.A., Hollaender,A., Plenum Publishing Corp. 1985

Schuster,H., Mikolajczyk,M., Rohrschneider,J., Geschke,B.: Ø X174 DNA-dependent DNA synthesis in vitro: Requirement for P1 ban protein in dnaB mutant extracts of Escherichia coli. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72, 3907-3911 (1975)

Scott,J.R.: Regulation of plasmid replication. Microbiol. Reviews 48, 1-23 (1984)

Shen,L.L., Perret,A.G.: Mechanism of inhibition of DNA gyrase by analogues of nalidixic acid: The target of the drugs is DNA. Proc. natl. Acad. Sci. USA 82, 307-311 (1985)

Shine,J., Dalgarno,L.: The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense tripletts and ribosome binding sites. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71, 1342-1346 (1974)

Shivakumar,A.G., Hahn,J., Dubnau,D.: Studies on the synthesis of plasmid-coded proteins and their control in Bacillus subtilis minicells. Plasmid 2, 279-289 (1979)

Shorenstein,R.G., Losick,R.: Comparative size and properties of the sigma subunits of ribonucleic acid polymerase from Bacillus subtilis and Escherichia coli. J.Biol.Chem. 248, 6170-6173 (1973)

Siebenlist,U., Simpson,R.B., Gilbert,W.: E.coli RNA polymerase interacts homologously with two different promoters. Cell 20, 269-281 (1980)

Spector,P.: Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation: A simple and linear spectrophotometric assay for 0,5 to 50 µg protein. Anal.Biochem. 86, 142-146 (1978)

Stallcup,M.R., Sharrock,W.J., Rabinowitz,J.C.: Ribosome and messenger specificity in protein synthesis by bacteria. Biochem.Biophys.Res.Commun. 58, 92-98 (1974)

Staudenbauer,W.L.: Novobiocin - a specific inhibitor of semiconservative DNA replication in permeabilized Escherichia coli cells. J.Mol.Biol. 96, 201-205 (1975)

Staudenbauer,W.L.: Replication of small plasmids in extracts of Escherichia coli. MGG 145, 273-280 (1976)

Staudenbauer,W.L.: Structure and replication of the Colicin E1 plasmid. Current Topics in Microbiology and Immunology 83, 93-156 (1978)

Stuitje,A.R., Veltkamp,E., Weijers,P.J., Nijkamp,H.J.: Origin and direction of replication of the bacteriocinogenic plasmid CloDF13. Nucl.Acids.Res. 6, 71-80 (1979)

Sugino,A., Goodman,H.M., Heyneker,H.L., Shino,J., Boyer,H.W., Cozzarelli,N.R.: Interaction of bacteriophage T4 RNA and DNA ligases in joining of duplex DNA at base-paired ends. J.Biol.Chem. 252, 3987-3994 (1977)

Sutcliffe,J.G.: Complete nucleotide sequenz of the Escherichia coli plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 43, 77-90 (1978)

Tomizawa,J., Itoh,T.: Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6096-6100 (1981)

Tomizawa,J., Sakakibara,Y., Kakefuda,T.: Replication of colicin E1 plasmid DNA in cell extracts: Origin and direction of replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2260-2264 (1974)

Venema,G., Canosi,U.: The effect of trimethylpsoralen crosslinks on entry of donor DNA in transformation and transfection of Bacillus subtilis. MGG. 179, 1-11 (1980)

Vieira,J., Messing,J.: The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19, 259-268 (1982)

Vogt,V.M.: Purification and further properties of single-strand-specific nuclease from Aspergillus orycae. Eur.J.Biochem. 33, 192-200 (1973)

Winshell,E., Shaw,W.V.: Kinetics of induction and purification of chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistent Staphylcoccus aureus. J.Bacteriol. 98, 1248-1257 (1969)

Yanish-Perron,C., Vieira,J., Messing,J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119 (1985)

Yansura,D.G., Henner,D.J.: Use of the Escherichia coli lac repressor and operator to control gene expression in Bacillus subtilis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 439-443 (1984)

Young,F.E., Smith,C, Reilly,B.E.: Chromosomal localization of genes regulating resistance to bacteriophage in Bacillus subtlis. J.Bacteriol. 98, 1087-1097 (1969)

Zinder,N.D., Boeke,J.D.: The filamentous phage (Ff) as vectors for recombinant DNA - a review. Gene 19, 1-10 (1982)

Zubay,P.; Ann. Rev. Genetics 7, 267-287 (1973)

9. LEBENSLAUF

Name	:	Gunnar Bläss
geboren am	:	23.12.1958
in	:	Berlin-Steglitz
Schulausbildung:		
1965-1966	:	Besuch der Evangelischen Volksschule in Monheim/NRW
1966-1968	:	Besuch der Gemeinschaftsschule Sandberg in Monheim
1968-1977	:	Besuch des Otto-Hahn-Gymnasiums in Monheim
1977	:	Abitur
Studium	:	
1977	:	zum Wintersemester Immatrikulation an der Universität Düsseldorf im Fach Biologie
1977-1979	:	Grundstudium im Fach Biologie
1979	:	Diplom-Vorprüfung im Fach Biologie
1980	:	zum Sommersemester Immatrikulation an der Freien Universität Berlin im Fach Biologie
1980-1982	:	Hauptstudium im Fach Biologie
1982-1983	:	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik,Berlin Abteilung: Prof.Dr.H.Schuster Arbeitsgruppe: Prof.Dr.W.Staudenbauer
1983	:	Diplom-Hauptprüfung
1983-1985	:	Anfertigung der Dissertation am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1983 bis Oktober 1985 in der Abteilung von Herrn Prof.Dr.H.Schuster am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin durchgeführt.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.H.Schuster, der die Durchführung dieser Arbeit in seiner Abteilung in großzügiger Weise förderte und ermöglichte.
Ich danke Herrn Dr.G.Hillenbrand für die aktive Unterstützung und Betreuung der Arbeit. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Frau Dr.B.Dreiseickelmann für ihre fördernde Kritik und ihre ständige Hilfsbereitschaft. Ich danke Herrn Prof.Dr.W.Staudenbauer für die produktiven Diskussionen und Anregungen, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts.
Herrn Prof.Dr.R.Diaz, Herrn Dr.J.Alonso und Herrn Dr.T.Böldicke danke ich für ihre Vorschläge und ihre Diskussionsbereitschaft. Für den Expressionsvektor pJF118(E,H) möchte ich mich bei Herrn J.P.Fürste und bei Herrn Dr.E.Lanka bedanken. Für die Einführung in die elektronenmikroskopische Technik gilt mein Dank Frau B.Rückert, Herrn R.Lurz und Frau G.Morelli. Für ihre Hilfe bei einigen technischen Problemen danke ich Herrn D.Vogt und Frau M.Warmuth, für die bei der Dokumentation dieser Arbeit geleistete Hilfe Frau K.Beuge, Frau E.Philippi, Frau I.Popella und Frau U.Liebing.